



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITOS CITOTÓXICOS E BIOCOMPATIBILIDADE DOS MATERIAIS DENTÁRIOS NAS CÉLULAS DA MUCOSA ORAL

Trabalho submetido por
Sara Raquel Carvalheiro Rua
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITOS CITOTÓXICOS E BIOCOMPATIBILIDADE DOS MATERIAIS DENTÁRIOS NAS CÉLULAS DA MUCOSA ORAL

Trabalho submetido por
Sara Raquel Carvalheiro Rua
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

Outubro de 2013

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer à minha orientadora, Professora Isabel Barahona por todo o apoio, por toda ajuda e pela disponibilidade que sempre demonstrou para comigo. O seu apoio foi essencial na realização desta monografia.

A todos os professores e funcionários por todo o apoio prestado ao longo destes 5 anos.

Gostaria de agradecer a todos os meus colegas e amigos pela amizade e apoio que me deram ao longo destes 5 anos de curso. Em especial à Gunel Kizi, Sofia Lopes e Irina Farto. Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e por estarem presente sempre que precisei.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional, por estarem sempre presentes e por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por tudo o que me ensinaram ao longo da minha vida.

RESUMO

As resinas compostas são biomateriais, normalmente utilizadas na prática clínica nomeadamente em Medicina Dentária, com o objectivo de reabilitar a estrutura dentária perdida devido a cáries, processos erosivos e fracturas, bem como a função e a estética.

Idealmente, os materiais dentários não deveriam produzir efeitos adversos nos tecidos orais, nomeadamente as resinas compostas amplamente utilizadas pelos profissionais de saúde oral, no entanto, estas libertam substâncias que podem comprometer a sua biocompatibilidade. Os monómeros residuais que são libertados deste tipo de materiais são o resultado do grau de polimerização incompleto ou de processos de degradação e de erosão.

O objectivo desta monografia foi identificar quais os principais métodos utilizados para a avaliação do potencial citotóxico dos materiais utilizados correntemente, como as resinas compostas, os mecanismos celulares afectados de modo a sensibilizar o Médico Dentista sobre os eventuais riscos.

Actualmente existe uma grande variedade de testes biológicos: *in vitro* e *in vivo*. Estes permitem a avaliação da resposta biológica dos tecidos aos materiais dentários. Os constituintes das resinas compostas, nomeadamente os monómeros podem ser libertados desencadeando nas células efeitos citotóxicos e genotóxicos comprometendo assim as funções básicas das células. Todos os monómeros apresentam citotoxicidade, que se traduz essencialmente na diminuição dos níveis intracelulares de glutathione e no aumento de espécies reactivas de oxigénio provocando deste modo morte celular. Esta resulta maioritariamente em apoptose das células expostas a este tipo de materiais. O efeito genotóxico resulta da acção dos monómeros nas células provocando danos no DNA. Além disso, podem provocar inflamação nos tecidos adjacentes a estes materiais, inibir as funções celulares dos odontoblastos e consequentemente conduzir a atrasos nos processos de mineralização. A comparação dos efeitos dos vários monómeros caracterizados neste trabalho indica que o Bis-GMA é o mais citotóxico.

Palavras-chave: *Biocompatibilidade, citotoxicidade, resinas compostas, monómeros*

ABSTRACT

The composites are biomaterials typically used in clinical practice particularly in dentistry, in order to rehabilitate the structure lost due to dental caries, erosion and cracks, as well as the function and aesthetics.

Ideally, dental materials should not produce adverse effects on the oral tissues, including the resins widely used by dental professionals, however, they release substances that can compromise the biocompatibility. The residual monomers which are release of such materials are the result of incomplete degree of polymerization or degradation and erosion.

The aim of this monograph was to identify what the main methods used to assess the cytotoxic potential of currently used materials such as composites, the cellular mechanisms affected in order to sensitize the dentist about possible risks.

Currently there is a wide variety of biological tests: *in vitro* and *in vivo*. These allow the assessment of the biological response of tissues to dental materials. The constituents of the composites, including the monomers can be released in triggering cell cytotoxic and genotoxic effects thus compromising the basic functions of the cells. All monomers exhibit cytotoxicity, which consists principally in reducing the intracellular levels of glutathione and an increase in reactive oxygen species thereby causing cell death. This mainly results in apoptosis of cells exposed to such materials. The genotoxic effect resulting from the action of the monomers in the cells causing DNA damage. Moreover, they can cause inflammation in tissues adjacent to these materials, inhibit the cellular functions of odontoblasts and therefore lead to delays in mineralization processes. A comparison of the effects of various monomers characterized in this work indicate that the Bis- GMA is the most cytotoxic.

Keywords: *biocompatibility, cytotoxicity, composite resins, monomers.*

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	15
II. DESENVOLVIMENTO	17
1. BIOCOMPATIBILIDADE.....	17
1.1 Testes de biocompatibilidade	18
1.1.1 Testes <i>in vitro</i>	18
1.1.1.1 Testes de citotoxicidade.....	20
1.1.1.2 Testes do metabolismo celular ou função celular	21
1.1.1.3 Testes de barreira (testes indirectos).....	23
1.1.1.4 Outros testes da função celular	24
1.1.1.5 Testes Genotoxicidade	24
1.1.1.6 Testes de estrogenicidade	25
1.1.2 Testes em animais	26
1.1.3 Testes Clínicos	26
2. RESINAS COMPOSTAS.....	27
2.1 Composição	27
2.1.1 Matriz Orgânica de Resina.....	28
2.1.2 Partículas de Carga	31
2.1.3 Agente de União	31
2.2 Propriedades das resinas compostas	32
2.2.1 Grau de Conversão e Monómeros Residuais	32
2.2.2 Absorção de água e solubilidade.....	38
2.2.3 Biodegradação das resinas compostas	40
3. TOXICOLOGIA MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS LIBERTADAS PELAS RESINAS COMPOSTAS.	43
3.1 Toxicidade Sistémica.....	43
3.2 Toxicidade Local	44

3.2.1	Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade, Estrogenicidade	45
3.2.2	Mecanismos moleculares	47
3.2.2.1	TEGDMA	47
3.2.2.1.1	Efeito das espécies reactivas de oxigénio e da glutathione na toxicidade do TEGDMA	51
3.2.2.1.2	Indução Apoptose/Necrose pelo TEGDMA	54
3.2.2.1.3	Dano no DNA e Regulação do Ciclo Celular	59
3.2.2.1.4	Sistema Imunitário e Marcadores Inflamatórios	63
3.2.2.2	HEMA	66
3.2.2.3	Bis-GMA	74
3.2.2.4	UDMA	78
3.2.2.5	Componentes do Sistema de Polimerização	78
III.	CONCLUSÕES	81
IV.	BIBLIOGRAFIA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagem microscópica da interacção entre um material e os fibroblastos do ligamento periodontal (Powers & Sakaguchi, 2006a)	21
Figura 2: Redução do MTT a formazan pela enzima redutase mitocondrial (Powers & Sakaguchi, 2006a)	22
Figura 3: Teste de difusão de agar com resina composta com o corante vermelho neutro (Schmalz, 2009a).....	24
Figura 4: Composição das resinas compostas (Noort, 2007)	27
Figura 5: Estrutura química do Bis-GMA (Rawls & Whang, 2012b)	28
Figura 6: Estrutura química do monómero TEGDMA (Rawls & Whang, 2012b)	29
Figura 7: Estrutura química do monómero UDMA (Rawls & Whang, 2012b).....	29
Figura 8: Estrutura química do monómero HEMA (Krifka, Spagnuolo, Schmalz & Schweikl, 2013).....	29
Figura 9: Estrutura química da canforoquinona (Volk et al., 2009)	30
Figura 10: Grau de Conversão (Rawls & Whang, 2012a)	32
Figura 11: Libertação cumulativa de componentes a partir de um compósito à base de resina em percentagem do peso da amostra de compósito (Schmalz, 2009b).....	35
Figura 12: Tecidos que podem ser atingidos pelas substâncias que são libertadas, devido à degradação dos materiais de restauração (Anusavice, 2012).....	44
Figura 13: Metabólitos do ácido metacrílico durante a degradação do TEGDMA de acordo com Reich et al. (Emmler et al., 2008)	48
Figura 14: Interacção entre as resinas compostas e os fibroblastos pulpares (Gregson et al., 2009).....	49
Figura 15: Esquema sobre a influência do TEGDMA no metabolismo celular (Schmalz, 2009b).....	50
Figura 16: Produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e respostas celular (Schweikl et al., 2006).....	51
Figura 17: Reacção do tipo Michael proposta com uma redução da formação da glutathione levando à formação de um conjugado TEGDMA/glutathione (Martins et al., 2012).....	53
Figura 18: Principais vias bioquímicas envolvidas na apoptose celular (Ribeiro & Oliveira, 2008).....	56

Figura 19: Modelo da indução da genotoxicidade nas células de mamíferos pelo TEGDMA e as respostas celulares (Schweikl et al., 2006).....	59
Figura 20: Resposta celular aos monómeros (Schmalz et al.,2011).....	62
Figura 21: Inflamação gengival associada a restaurações à base de resina composta (Schmalz, 2009b).....	65
Figura 22: Metabolismo proposto do ¹⁴ C-HEMA no rato (Durner et al., 2009)	67
Figura 23: Dermatite de contacto na extremidade do dedo de um médico dentista após o contacto com uma resina composta (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009).....	69
Figura 24: Exposição ao HEMA, após 24 horas era detectada e quantificada por citometria de fluxo os HGFs apoptóticos e necróticos (Spagnuolo et al., 2006)	71
Figura 25: Redução da secreção do TNF- α nos monócitos (Anusavice, 2012).....	73
Figura 26: Produtos da metabolização do Bis-GMA (Kostoryz et al., 2003)	75
Figura 27: Mecanismo da produção de ROS induzida pelo Bis-GMA (Chang et al., 2010).....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Toxicidade sistémica dos monómeros que constituem as resinas compostas (Schmalz, 2009b).....	43
Tabela 2: Citotoxicidade dos monómeros e iniciadores utilizados nas resinas compostas nos fibroblastos do rato (Schmalz, 2009b)	46
Tabela 3: Diferenças entre apoptose (morte celular programada) e necrose (morte celular patológica) (Batarseh, 2011).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

γ -MPTS	γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano
2,3-EMA	2,3- ácido epóxi metacrílico
^{51}Cr	Radiocrómio
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina-trifosfato
BADPE-4OH	Éster bisfenol A bis (2,3- dihidroxipropil)
BHT	Hidroxitolueno Butilado
Bis-EMA	Bisfenol A dimetacrilato etoxilado
Bis-GMA	Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila
BPO	Peróxido de benzoílo
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
CDFH-DA	2',7'- DICloroflureceína
CE	Colesterol esterase
CQ	Canforoquinona
CYP	Enzimas do citocromo P450
DCFH-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DL50	Dose Letal 50%
DMABEE	4 - (dimetilamino) - o ácido benzóico etil éster
DMAEMA	Dimetilamino Etil Metacrilato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EGDMA	Etilenoglicol Dimetacrilato

ELISA	Método imune-enzimático indirecto
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
GSTP1	Glutathione transferase P1
H ₂ DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HeLa	Células epiteliais Humanas
HEMA	Hidroxietil Metacrilato
HGF	Fibroblastos gengivais humanos
HMDMA	Hexametileno dimetacrilato
HO-1	Heme oxygenase-1
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPRT	Teste da hipoxantina guanina ribosil transferase
Hsp 72	Proteínas de choque térmico
ISO	<i>International Organization Standardization</i>
JNKs	Proteína quinase N-terminais Jun
L-929	Fibroblastos transformados do rato
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAA	Ácido metacrílico
MAPK	Proteína quinase activada por mitógeno

mBCl	<i>Monochlorobimane</i>
MBrB	<i>Monobromobimane</i>
MCF-7	Linhas celulares do adenocarcinoma da mama
MTT	Ensaio do brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PCE	Pseudocolinesterase
PGE2	Prostaglandinas E2
PI	Corante de iodeto de propídio
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
TC50	Concentração tóxica mediana
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
THP-1	Protótipos vacinais em linhagem de monócitos humanos
TNF	Factor de necrose tumoral
TRL	Receptores <i>toll-like</i>
UDMA	Uretano Dimetacrilato
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonilo]-2H hidróxido tetrazólio

I. INTRODUÇÃO

Os materiais dentários são amplamente utilizados numa grande proporção da população. A maioria desses materiais são utilizados para a restauração de dentes, que consiste na colocação de uma substância que vai substituir a porção de dente perdido, por cárie ou fracturas, de modo a proteger e a reabilitar não só a função como a estética. São muitos os factores que vão influenciar o tipo de material a ser usado numa determinada situação, como por exemplo a localização uma vez que a estética é essencial nos dentes anteriores e a força mecânica é importante na zona posterior, a durabilidade, o custo entre outros (Ferracane, 2011).

Durante muitos anos os materiais disponíveis para a restauração de dentes eram à base de metal como é o caso da amálgama e o ouro. Estes materiais apresentavam uma grande dureza e durabilidade no entanto, apresentavam algumas desvantagens, como a estética, exigiam um preparo cavitário mais invasivo e devido à presença de mercúrio na sua constituição podia provocar efeitos nocivos (Margeas, 2008).

Muitos materiais dentários, com cor semelhante ao dente, foram introduzidos há mais de 50 anos atrás, por volta dos anos 1950, e tornaram-se bastante populares. Estes materiais para além de serem mais estéticos, são mais conservadores, visto que a remoção de estrutura dentária é menor e não contém mercúrio. A composição e as propriedades destes materiais são muito distintas e incluem as resinas compostas, ionómero de vidro, entre outros (Peutzfeldt, 1997; Ferracane, 2011).

As resinas compostas são hoje em dia, um dos materiais mais utilizados não só para restaurar e mimetizar a estrutura natural do dente mas também para alterar a forma, cor e tamanho dos dentes. As resinas compostas são estruturas complexas compostas por uma matriz polimérica, constituída por vários monómeros e partículas inorgânicas, a união de ambas é estabelecida por agentes de acoplamento, que normalmente é o silano (Rawls, 2012a).

Um material de restauração deve idealmente apresentar um certo número de características das quais se destacam a estabilidade dimensional, resistência às forças mecânicas, resistência ao desgaste, estabilidade de cor, bactericida, de fácil colocação e deve ser biocompatível (Margeas, 2008). A biocompatibilidade dos materiais dentários é uma questão de grande importância para os dentistas, doentes, serviço público de

saúde, autoridades competentes, no entanto, os resultados acerca da biocompatibilidade dos materiais dentários são ainda controversos. Muitos testes *in vitro* foram realizados e mostraram que os compósitos podem provocar reacções de hipersensibilidade e muitos dos seus componentes têm sido identificados como agentes citotóxicos, ou seja, podem provocar alterações na função biológica da célula podendo mesmo resultar em morte celular (Pietro et al., 2008). Qualquer material que seja colocado no organismo vai estabelecer interacções com os tecidos circundantes resultando numa resposta biológica (Vital, Silva, Souza, Ferreira & Vital, 2008). No caso das resinas compostas a resposta biológica indesejável é atribuída à libertação dos monómeros, que resultam de um grau de polimerização das resinas normalmente incompleto ou a processos de degradação (Pietro et al., 2008).

Inicialmente, a biocompatibilidade de um biomaterial aplicava-se apenas a substâncias que não provocavam efeitos adversos quando colocadas no organismo, ou seja, se fossem inertes. Esta definição foi evoluindo, uma vez que os materiais estabelecem sempre interacções com o organismo. Actualmente, biocompatibilidade é definida pela capacidade de um material desencadear uma resposta apropriada no organismo numa determinada situação (Schedle, Örtengren, Eidler, Gabauer & Hensten, 2007).

As resinas compostas estão associadas a várias reacções adversas e ocupacionais que dependem de vários factores. A *International Organization Standardization* (ISO) e o *Council on Dental Materials, instruments and Equipment of the American Dental Association* propuseram a realização de vários testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a biocompatibilidade e a citotoxicidade destes materiais (Vital et al., 2008).

Esta monografia foi realizada com base numa pesquisa na *Medline* e tem como objectivos primordiais:

- Identificar os principais métodos utilizados para medir e prever as respostas biológicas aos materiais dentários;
- Identificar os factores que contribuem para os efeitos citotóxicos dos materiais dentários, nomeadamente das resinas compostas;
- Elucidar acerca dos efeitos citotóxicos dos monómeros que constituem as resinas compostas, de modo a sensibilizar os médicos dentistas para os problemas deste tipo de materiais dentários.

II. DESENVOLVIMENTO

1. BIOCOMPATIBILIDADE

Quando um material é colocado em contacto com o corpo humano, é normalmente referido como um biomaterial. Um biomaterial pode ser definido como um material não vital que interage com os sistemas biológicos. Durante o seu desenvolvimento devemos considerar não só a força, a estética e os aspectos funcionais do material, mas também a biocompatibilidade. Dentro dos biomateriais utilizados em medicina dentária podemos destacar os materiais de restauração dentária, no qual incluímos as resinas compostas (Anusavice, 2012).

Quando um material é colocado em contacto com os tecidos e fluídos do corpo humano, há uma interacção entre esse material e o sistema biológico. Estas interacções desencadeiam uma resposta biológica. Inicialmente, William (1987), definiu biocompatibilidade como a capacidade de um material desempenhar a sua função com uma resposta apropriada do hospedeiro numa situação específica (Wataha, 2012). Devido à dinâmica da interacção entre os tecidos e os materiais, William (2008), redefiniu o conceito de biocompatibilidade descrevendo-a como a capacidade de um biomaterial desempenhar a função pretendida de acordo com o tratamento, sem desencadear qualquer efeito indesejável, seja local ou sistémico no hospedeiro, além de provocar uma resposta celular benéfica e adequada para essa situação específica, de modo a otimizar o desempenho clínico dessa terapia (Wataha, 2012).

No que diz respeito aos materiais dentários, nenhum ou quase nenhum é inerte do ponto vista biológico, uma vez que a grande maioria apresenta uma variedade de substâncias tóxicas ou irritantes. Além disso, a interacção estabelecida entre o material e o hospedeiro é dinâmica dependendo de vários factores, que influenciam igualmente a biocompatibilidade, tais como: localização do material, a sua natureza química e física, o tipo de tecidos que vão estar expostos ao material, tempo de exposição, quantidade e a natureza das substâncias eluídas a partir do material, entre outros (Wataha, 2012).

A avaliação da biocompatibilidade dos materiais utilizados em medicina dentária é muito complexa tendo o material de ser submetido a diversos tipos de testes biológicos, testes das propriedades físicas tal como a corrosão e análise risco-benefício (Wataha, 2001).

1.1 Testes de biocompatibilidade

Existe, hoje em dia, uma grande variedade de testes biológicos que podem ser usados para nos assegurarmos que os materiais não vão agredir os sistemas biológicos. Estes testes podem ser classificados em testes *in vitro*, animais e clínicos (Wataha, 2001).

1.1.1 Testes *in vitro*

As respostas biológicas aos materiais dentários podem ser avaliadas de diferentes formas, no qual estão incluídos um importante grupo de testes, os **testes *in vitro***. Por definição os testes *in vitro* são descritos como aqueles que são realizados fora do organismo (Wataha, 2012). Neste tipo de testes o contacto entre o material a ser testado e as células pode ser de três formas: por contacto directo, indirecto ou por contacto apenas com extractos do material (Moharamzadeh, Brook & Noort, 2009). O contacto directo expõe o material directamente ao sistema biológico, enquanto que o contacto indirecto envolve uma barreira permeável, como por exemplo uma camada de agar, um filtro Millipore ou uma membrana de dentina (Anusavice, 2012). A utilização dos extractos do material tem sido uma técnica para a avaliação da citotoxicidade de diversos materiais dentários dos quais se destacam as resinas compostas. Neste tipo de testes os materiais são dissolvidos, por exemplo, em dimetilsulfóxido ou etanol, e posteriormente diluídos num meio de cultura (Moharamzadeh et al., 2009). O tipo de meio de diluição utilizado e o tempo de duração vão condicionar as substâncias que são libertadas das resinas compostas, porém podem levar a resultados falsos negativos no que diz respeito à citotoxicidade dos materiais (Moharamzadeh et al., 2009).

Os sistemas biológicos podem consistir em cultura de células ou constituintes celulares, como por exemplo células de mamíferos, tecidos, bactérias e organitos celulares (Anusavice, 2012). A avaliação da citotoxicidade dos materiais dentários é normalmente realizada em cultura de células em monocamada ou mais recentemente em modelos tridimensionais de engenharia de tecidos (Moharamzadeh et al., 2009). As células em monocamada geralmente utilizadas para avaliar a toxicidade dos materiais, são os queratinócitos ou os fibroblastos gengivais, uma vez que são células que estão normalmente em contacto com os materiais quando estes são colocados na cavidade oral, além disso, proliferam facilmente no meio de cultura e apresentam uma grande sensibilidade nos testes de citotoxicidade (Moharamzadeh et al., 2009). No entanto, podem ser ainda utilizados outros tipos de células, tais como, os fibroblastos do rato L-

929 ou os fibroblastos 3T3. Contudo, a principal limitação da utilização de células em cultura é a falta de relevância clínica, visto que não apresentam as propriedades de barreira das células da mucosa oral. De modo a ultrapassar esta limitação surgiram os modelos tridimensionais de engenharia de tecidos, que apresentam barreiras de modo a simular melhor as situações clínicas e permitir a análise de várias respostas das células quando expostas aos materiais dentários (Moharamzadeh et al., 2009).

Os testes que medem a citotoxicidade *in vitro* podem ser subdivididos naqueles que medem o crescimento celular, o efeito metabólico ou outras funções celulares e nos que medem o efeito no material genético da célula (estudos mutagénicos) (Powers & Sakaguchi, 2006a).

A análise dos resultados dos diferentes testes *in vitro* vai permitir uma avaliação qualitativa ou quantitativa dos efeitos citotóxicos provocados pelos materiais em estudo. A avaliação quantitativa mede a morte celular ou inibição do crescimento celular, proliferação ou formação de colónias celulares. Esta avaliação utiliza meios objectivos que quantificam o número de células, a quantidade de proteínas, a libertação de enzimas, a redução do corante vital ou qualquer outro parâmetro mensurável. Considera-se que um material desencadeia efeitos citotóxicos quando provoca uma redução da viabilidade celular superior a 30% (ISO 10993-5, 2009). No que diz respeito à avaliação qualitativa, ela é feita ao microscópio e por vezes com auxílio de coloração citoquímica, observa as alterações que são verificadas ao nível da morfologia celular, vacuolização, destacamento do meio de cultura, lise celular e integridade da membrana das células após a exposição aos materiais em estudo (ISO 10993-5, 2009). O resultado desta avaliação é apresentado numericamente de 0 a 4, sendo que um resultado superior a 2, considera-se que o material pode desencadear efeitos citotóxicos (ISO 10993-5, 2009).

Os testes *in vitro* têm várias vantagens, tais como serem experimentalmente controláveis, standardizados, permitirem uma análise em grande escala, rápidos, relativamente económicos e simples. Possivelmente a sua grande desvantagem é que a relevância clínica é questionável, uma vez que não conseguem reproduzir as interacções que existem entre o organismo e o sistema circulatório, inflamatório e imunitário. Consequentemente podem levar a resultados contraditórios sobre as respostas biológicas aos materiais (Wataha, 2001, 2012).

Existem dois tipos de células que podem ser usados nos testes *in vitro*, mas a escolha do tipo de linha celular para a avaliação da citotoxicidade dos materiais continua a ser um tema controverso, uma vez que a citotoxicidade do material pode ser significativamente afectada pelo tipo de linha celular e pelo tipo de teste escolhido (Murray, Godoy & Godoy, 2007). As células primárias são aquelas células que são extraídas directamente de organismos, tais como os fibroblastos pulpares ou gengivais. Estas células vão proliferar durante um tempo limitado em cultura, mas mantêm as características das células *in vivo*. As células contínuas ou linhas celulares permanentes são células primárias transformadas previamente para permitir o crescimento ilimitado em cultura, como é o caso dos fibroblastos transformados do rato (clone L-929) e as células epiteliais humanas (HeLa). Devido a esta transformação, as células perdem algumas das características das células *in vivo*. A cultura de células primárias parece ser mais fiável para a medição da citotoxicidade dos materiais (Ekwall, Silano, Paganuzzi-Stammati e Zucco, 1990). No entanto, apresentam restrições, visto que como provêm apenas de um indivíduo, estas células apresentam uma variabilidade genética limitada e perdem rapidamente a sua funcionalidade uma vez colocadas em cultura. As linhas celulares são mais homogéneas e apresentam uma estabilidade metabólica e genética que contribui para a padronização dos estudos. Podemos concluir que tanto as células primárias como as linhas celulares desempenham um papel importante nos testes *in vitro* e ambas devem ser usadas no estudo de qualquer material (Ekwall et al., 1990).

1.1.1.1 Testes de citotoxicidade

Um dos exemplos dos testes de citotoxicidade é o teste em culturas de células no qual o material é colocado directamente em contacto com as células que foram retiradas do tecido original, de uma cultura de células primárias ou de uma linhagem celular já estabelecida em cultura por desagregação enzimática, mecânica ou química (Vital et al., 2008). Neste caso, avalia-se o comportamento de um determinado material quando é colocado em contacto com as células, ou seja, analisa-se a morte celular através da medição do número de células vivas antes e após o contacto com o material (Gociu et al., 2013). Caso o material não seja citotóxico (figura 1A), as células continuam aderentes ao frasco de cultura de células e com morfologia normal, caso contrário pode haver inibição do crescimento celular, presença de características citopáticas e as células perdem a adesão ao frasco de cultura, como podemos ver na figura 1B (Gociu et al., 2013).

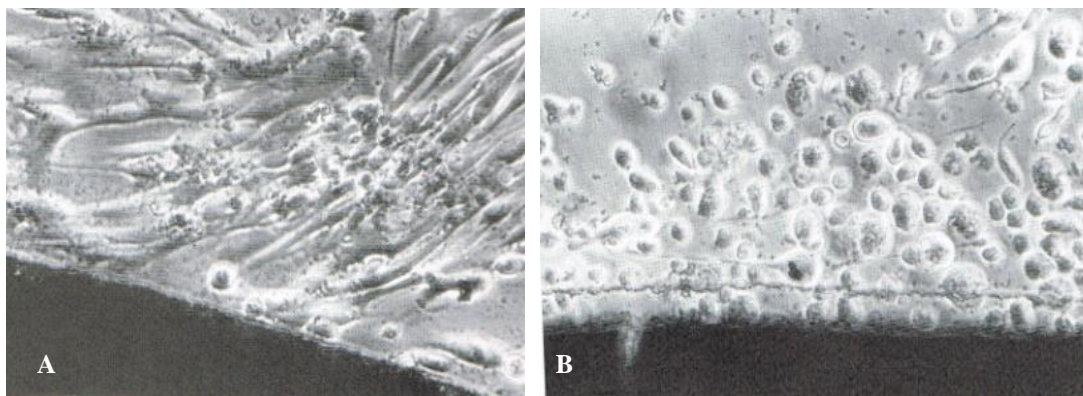


Figura 1: Imagem microscópica da interacção entre um material e os fibroblastos do ligamento periodontal (Powers & Sakaguchi, 2006a)

Outro dos testes que permite a avaliação da citotoxicidade dos materiais é o estudo da integridade da membrana. Este teste mede a impermeabilidade da membrana celular que quando as células estão vivas é capaz de excluir moléculas extracelulares e considera-se que a ruptura da membrana celular corresponde à morte celular. Pode ser colorimétrico ou fluorescente e exige a utilização de corantes, que podem ser vitais ou não vitais. No caso dos corantes vitais, como por exemplo o radiocrómio (^{51}Cr) e o vermelho neutro, estes são transportados activamente e são conservados dentro das células a não ser que os efeitos citotóxicos do material comprometam a integridade da membrana e consequentemente, o aumento da sua permeabilidade. Os corantes não vitais, tal como o azul de tripano, não são transportados activamente e são apenas absorvidos caso a integridade da membrana esteja comprometida e neste caso estamos perante um material citotóxico. Estes testes avaliam apenas a permeabilidade da membrana e consequentemente a morte celular, enquanto que as alterações celulares não são avaliadas (Murray et al., 2007).

1.1.1.2 Testes do metabolismo celular ou função celular

Este tipo de testes avaliam a citotoxicidade dos materiais através da avaliação da viabilidade e da proliferação celular das células expostas aos materiais, como por exemplo a actividade enzimática, a síntese de DNA e de proteínas.

Um dos métodos utilizados para avaliar a proliferação celular é através da adição de um precursor radioisótopo, como por exemplo a ^3H -timidina, ao meio de cultura que é incorporado no DNA durante a proliferação celular e posteriormente através da avaliação da radioactividade detecta-se a quantidade de DNA formado (Moharamzadeh et al., 2009). Theilig et al. (2000), realizou um teste semelhante ao da ^3H -timidina, mas

adicionou 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) que é incorporado no DNA durante a divisão celular. Este composto é detectado por anticorpos fluorescentes e através da medição da fluorescência detecta-se a proliferação celular dos fibroblastos humanos e dos queratinócitos quando estes são expostos aos monómeros das resinas compostas (Moharamzadeh et al., 2009).

Um dos testes mais utilizados na avaliação da citotoxicidade dos materiais, tendo como base o metabolismo celular, é o ensaio do brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio foi proposto por Mossman (1983), é um ensaio colorimétrico que determina a viabilidade celular pelas alterações na actividade das desidrogenases mitocondriais permitindo assim avaliação da citotoxicidade de um determinado composto (Moharamzadeh et al., 2009). Este teste baseia-se na redução pelas desidrogenases do MTT, que é um sal solúvel de cor amarela, em formazan, que é um produto insolúvel de cor púrpura, tal como está exemplificado na figura 2 (Powers & Sakaguchi, 2006a). A concentração de formazan formada é determinada através de espectrofotometria. Esta conversão, ou seja a formação de formazan só acontece caso as células estejam viáveis. Assim, pode-se concluir que quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT, ou seja, a redução do MTT a formazan é directamente proporcional à actividade mitocondrial e à viabilidade celular (Powers & Sakaguchi, 2006a). Apesar de ser um método rápido e económico, este corante pode ser tóxico para as células (Moharamzadeh et al., 2009).

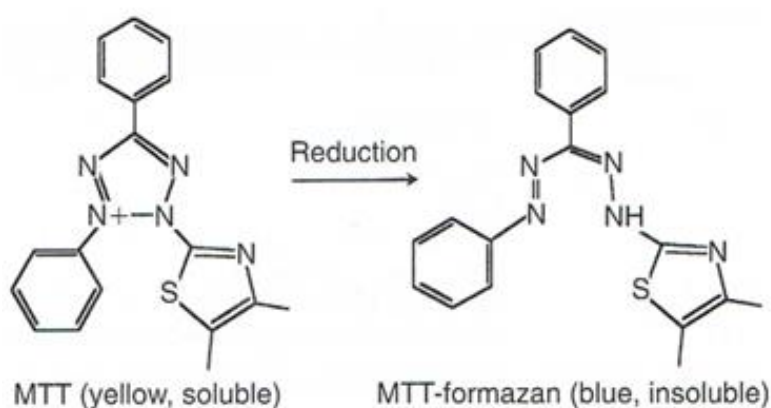


Figura 2: Redução do MTT a formazan pela enzima redutase mitocondrial (Powers & Sakaguchi, 2006a)

Outro método que permite avaliação quantitativa da proliferação celular é através do corante *Alamar Blue* que se baseia na actividade metabólica. Neste teste utiliza-se um indicador de oxidação-redução em que há uma alteração de cor devido a uma redução

química do meio de cultura e consequentemente crescimento celular. A alteração de cor pode ser medida através de espectrofotometria e pode utilizar tanto culturas de células em monocamada como culturas tridimensionais de células orais epiteliais (Moharamzadeh et al., 2009). Este teste tem vantagens em relação ao método do MTT, visto que não é tóxico para as células e podemos avaliar a viabilidade celular em mais do que uma ocasião, porém é mais dispendioso (Moharamzadeh et al., 2009).

Outro dos métodos colométricos utilizado é através da medição do lactato desidrogenase (LDH), que é uma enzima citosólica que é libertada pelas células caso a funcionalidade das membranas esteja comprometida possivelmente devido ao dano oxidativo ou até mesmo quando as células entram em citólise. A quantidade de LDH que é libertada é proporcional ao número células danificadas ou que sofreram lise celular (Moharamzadeh et al., 2009).

1.1.1.3 Testes de barreira (testes indirectos)

Os testes que normalmente são utilizados são os testes que utilizam células em cultura em que há um contacto directo com as células. No entanto, estes testes são clinicamente questionáveis visto que os materiais, como é o caso das resinas compostas, raramente estão em contacto directo com as células (Murray et al., 2007). Clinicamente há uma separação do material das células devido ao epitélio queratinizado, dentina ou matriz extracelular (Powers & Sakaguchi, 2006a). De modo a mimetizar a situação *in vivo* foram desenvolvidos testes de barreira ou testes indirectos (Murray et al., 2007).

Um dos primeiros testes de barreira a ser desenvolvidos foi o teste de difusão de agar que foi introduzido por Guess et al. e permite a avaliação qualitativa dos efeitos citotóxicos dos componentes que são libertados dos materiais a ser testados e que se difundem através da camada de agar que cobre a cultura de células, que normalmente são linhas celulares permanentes (Moharamzadeh et al., 2009). Podemos adicionar ao meio de cultura um corante, nomeadamente o vermelho neutro para a detecção dos efeitos citotóxicos. Caso as substâncias libertadas sejam tóxicas observa-se uma perda de cor do corante à medida que as células sofrem lise celular, como podemos observar na figura 3. Este tipo de teste é frequentemente utilizado para a avaliação da biocompatibilidade dos materiais dentários (Murray et al., 2007).



Figura 3: Teste de difusão de agar com resina composta com o corante vermelho neutro. A zona de descoloração à volta da amostra, indica que houve dano nas células (Schamlz, 2009a).

Wennberg et al. utilizou outro tipo de teste de barreira, o teste com filtros de Millipore, que permite igualmente uma avaliação qualitativa da citotoxicidade dos materiais dentários (Moharamzadeh et al., 2009).

Tanto o teste de difusão em agar como o teste com filtro de Millipore, não são semelhantes às barreiras que existem na cavidade oral, logo Outhwaite desenvolveu um novo teste, o de barreira de dentina (Murray et al., 2007).

1.1.1.4 Outros testes da função celular

Existem testes *in vitro* que vão avaliar a função imunitária e outras reacções tecidulares.

Os testes da função imunitária avaliam as respostas imunitárias e as alterações na quantidade de mediadores pró-inflamatórios nas células expostas aos materiais dentários bem como a proliferação, diferenciação, quimiotaxia, produção de citoquinas e alterações da actividade das células envolvidas na resposta imunitária, como as células T, macrófagos e linfócitos (Powers & Sakaguchi, 2006a).

1.1.1.5 Testes Genotoxicidade

O objectivo dos testes genotóxicos é avaliar as alterações provocadas pelo material em estudo no conteúdo genético celular, como é o caso do DNA ou dos cromossomas.

Um dos estudos utilizado na avaliação da genotoxicidade de um material é o teste *Ames*. Este teste utiliza uma bactéria geneticamente alterada (*his -*), *Salmonella typhimurium* que é colocada num meio de cultura deficiente em histidina no qual esta bactéria não

consegue proliferar nem formar colónias. A este meio é adicionado o material em estudo, caso o material ou os seus componentes sejam genotóxicos, vamos observar no meio de cultura a proliferação desta bactéria, porque o agente induziu mutações no DNA da bactéria, especificamente no gene que permite a síntese da histidina (*his* +). O número de colónias que é formada é um critério da mutagenicidade, ou seja, há uma alteração no genoma da bactéria que foi transmitida à geração seguinte (Moharamzadeh et al., 2009).

Além do teste *Ames*, temos outros métodos como o da Hipoxantina guanina Ribosil Transferase (HPRT), no qual se avalia as alterações nos genes que codificam a enzima HPRT e o teste dos micronúcleos (Schmalz, 2009a).

Estes testes *in vitro* que avaliam a genotoxicidade dos materiais dentários podem utilizar diferentes culturas das quais se destacam as células de mamíferos, como os fibroblastos V79 dos pulmões dos hamsters chineses, fibroblastos gengivais humanos, fibroblastos L929 de rato, linfócitos humanos e células do tecido glandular da parótida (Moharamzadeh et al., 2009).

1.1.1.6 Testes de estrogenicidade

Existem algumas técnicas *in vitro* que permitem a avaliação do potencial estrogénico dos materiais dentários, do qual se destaca o teste de proliferação celular com células MCF-7 (E-screen), que é um dos mais utilizados, o teste do receptor de ligação e o teste gene repórter, que utiliza linhas celulares e células de levedura (Moharamzadeh et al., 2009).

O teste E-screen baseia-se na capacidade das linhas celulares do adenocarcinoma da mama (MCF-7) proliferarem na presença de compostos estrogénicos. Para podermos quantificar o número de células que proliferaram, temos de utilizar grupos de controlo positivos, que neste caso é o 17 β -estradiol e grupos de controlo negativos, que é a ausência de substâncias estrogénicas. Após a comparação dos três grupos, um composto é considerado estrogénico quando a taxa de crescimento das células no grupo em estudo for superior à do controlo negativo, ou seja, sem substâncias estrogénicas (Moharamzadeh et al., 2009).

1.1.2 Testes em animais

Nos **testes em animais** o material é colocado dentro do organismo do animal. A vantagem deste tipo de teste é permitir uma resposta global de um sistema biológico mais complexo exposto ao material. Esta resposta biológica é mais compreensiva e mais relevante do que a obtida com os testes *in vitro*. No entanto, este teste apresenta desvantagens, uma vez que tem elevado custo, é difícil de ser controlado, é de longa duração e envolve muitos problemas éticos. Apesar de todas estas desvantagens, os testes em animais são essenciais para a avaliação de novos materiais.

1.1.3 Testes Clínicos

Os **testes clínicos** são os que apresentam maior relevância clínica e são considerados os “*Gold Standard*” para a avaliação do desempenho do material dentário, incluindo a resposta biológica (Wataha, 2012). Podem ser realizados em animais ou humanos, e neste caso dá-se o nome de ensaios clínicos (*clinical trials*). Neste tipo de testes os materiais são colocados dentro do organismo num ambiente biológico semelhante aquele que o material vai estar exposto na sua prática clínica, ao contrário do que se verificava nos testes em animais. Contudo, este tipo de testes apresenta algumas desvantagens incluindo a sua complexidade, difícil de serem controlados experimentalmente, interpretação e quantificação difícil, dispendiosos e também levantam algumas preocupações éticas.

Há cerca de 20 anos, que os investigadores reconheceram que a forma mais eficiente e com uma relação custo-benefício favorável para avaliar a biocompatibilidade dos materiais é utilizando a combinação dos testes *in vitro*, em animais e os testes clínicos, e que nenhum teste por si só é suficiente para avaliar ou caracterizar adequadamente a biocompatibilidade de um material. (Wataha, 2001)

Nestes últimos 5 anos novos testes têm sido desenvolvidos o que demonstra a complexidade de testar a biocompatibilidade dos materiais. Os três tipos de testes de biocompatibilidade continuam a ser úteis para a avaliação da biocompatibilidade do material, tanto durante o seu desenvolvimento como após a colocação clínica. Os testes *in vitro* além de serem úteis nas fases iniciais do desenvolvimento do material, podem ser também importantes para a avaliação das respostas biológicas específicas observadas durante os ensaios clínicos ou após a introdução do material no mercado.

2. RESINAS COMPOSTAS

As resinas compostas ou compósitos têm sido definidas como uma “combinação tridimensional de pelo menos dois materiais quimicamente diferentes com uma interface distinta que separa os componentes” (Peutzfeldt, 1997).

As resinas compostas são usadas principalmente como material de restauração, ou seja, vão substituir estrutura dentária perdida e podem também modificar a cor e o contorno dos dentes melhorando assim a estética facial. Existe uma grande variedade de resinas compostas ou com composições semelhantes disponíveis no mercado que podem ser utilizadas em várias áreas como selantes de fissura, cimentação de cerâmicas ou de restaurações indirectas, realização de coroas e cimentação de brackets e bandas. Além disso, as resinas compostas também podem ser usadas como coroas provisórias e pontes e mais recentemente como cimentos endodônticos (Ferracane, 2011). As resinas compostas foram introduzidas por volta do ano 1950, e representam hoje em dia um dos materiais mais importantes na prática clínica (Ferracane, 2011).

2.1 Composição

As resinas compostas são misturas complexas que contêm muitas substâncias. Elas englobam 3 componentes principais:

- Matriz de resina
 - Sistema de monómeros
 - Sistema de iniciadores-estabilizadores
- Carga Inorgânica que consiste em partículas tais como vidro, quartzo e/ou sílica
- Agente de união, normalmente é silano que liga quimicamente as partículas inorgânicas à matriz de resina (Vasudeva, 2009).

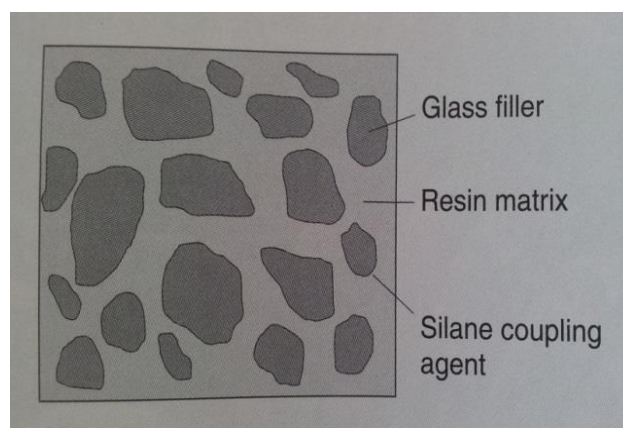


Figura 4: Composição das resinas compostas (Noort, 2007)

2.1.1 Matriz Orgânica de Resina

A matriz de resina da maioria dos compósitos consiste numa mistura de monómeros mono ou dimetacrilatos, aromáticos e/ou alifáticos, tais como o bisfenol A-metacrilato de glicidila (Bis-GMA) e uretano dimetacrilato (UDMA), que através de uma reacção de polimerização, dão origem a uma estrutura de polímeros ligados através de ligações covalentes (Rawls & Whang, 2012a). O dimetacrilato mais comumente utilizado é o Bis-GMA, que foi desenvolvido por Rafael Bowen no início de 1960 e deriva de uma reacção entre o bisfenol-A com glicidil éster metacrilato. Este monómero apresenta um elevado peso molecular, baixa expansão térmica, reduzida contracção de polimerização e baixa volatilidade (Fano, Shatel & Tanzi, 2007). Existem também outros compósitos que utilizam o UDMA em vez do Bis-GMA, ou então uma conjugação de ambos. Estas moléculas representam cerca de 20% (V/V) dos constituintes das resinas (Vasudeva, 2009).

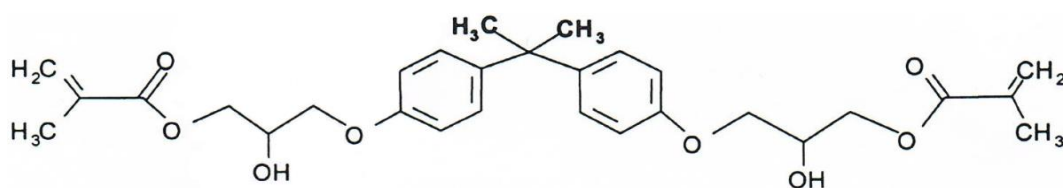


Figura 5: Estrutura química do Bis-GMA (Rawls & Whang, 2012b)

Tanto o Bis-GMA como UDMA são monómeros altamente viscosos devido ao seu elevado peso molecular, sendo difícil a sua manipulação. A viscosidade é uma medida da resistência ao fluxo das moléculas e um valor elevado de viscosidade indica a presença de interacções intermoleculares. Estas interacções podem causar uma diminuição da mobilidade dos monómeros durante a polimerização e diminuir a flexibilidade da rede polimérica (Sideridou, Tserki & Papanastasiou, 2002). A elevada viscosidade e a baixa mobilidade destes monómeros pode interferir com o grau de conversão do compósito. De modo a diminuir esta viscosidade e aumentar o número de ligações cruzadas, foram adicionados às resinas compostas monómeros de baixo peso molecular, ou seja, com menor viscosidade como é o caso do etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), sendo este último o mais utilizado, permitindo assim um aumento do grau de conversão e da incorporação de partículas de carga, que por sua vez melhora as propriedades das resinas, no que diz respeito à força, rigidez e coeficiente de expansão térmica (Gonçalves, Filho, Guimarães, Poskus & Silva, 2008). No entanto, esta diluição do Bis-GMA pelo

TEGDMA pode ter efeitos negativos como é o caso do aumento da contracção de polimerização (Vasudeva, 2009).

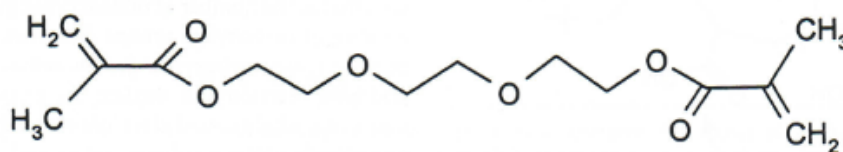


Figura 6: Estrutura química do monómero TEGDMA (Rawls & Whang, 2012b)

Citando Hergenrother et al. (1993), o UDMA foi desenvolvido por Foster e Walter em 1974 (Polydorou, König, Hellwig & Kümmerer, 2009; Vasudeva, 2009). UDMA é uma molécula alifática com elevado peso molecular. Apresenta dois grupos (-NH-), que promovem ligações intermoleculares de hidrogénio, aumentando assim a viscosidade das resinas. Por outro lado, permite à cadeia polimérica uma grande mobilidade, aumentando assim a o grau de conversão e a densidade das ligações cruzadas na matriz polimérica. No entanto, permite absorção de mais água, o que vai permitir a penetração de saliva na resina, potenciando a degradação hidrolítica, enzimática e aumento da libertação de monómeros e dos produtos de degradação (Poplawski, Loba, Pawlowska, Szczepanska & Blasiak, 2010).

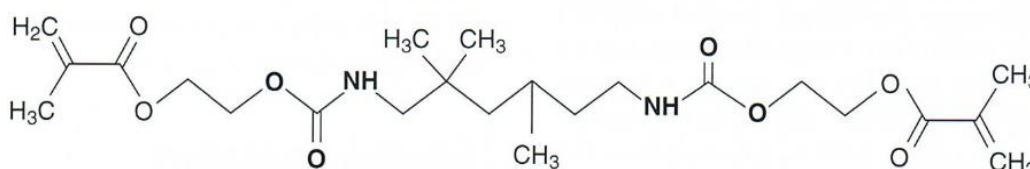


Figura 7: Estrutura química do monómero UDMA (Rawls & Whang, 2012b)

O hidroxietil metacrilato (HEMA) é um dos monómeros que também pode ser encontrado nas resinas compostas. Tem como vantagens a diminuição da viscosidade e como é relativamente hidrófilo, pode penetrar no *smear layer* aumentando assim a adesão mecânica e química das resinas à dentina (Gerzina & Hume, 1996).

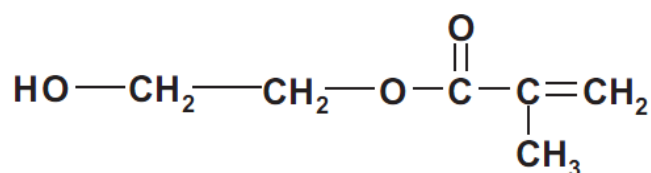


Figura 8: Estrutura química do monómero HEMA (Krifka, Spagnuolo, Schmalz & Schweikl, 2013)

Vários monómeros dimetacrilatos foram propostos para a formação da matriz polimérica dos compósitos, no entanto a maioria das resinas que existem hoje em dia no mercado apresentam uma mistura dos monómeros Bis-GMA e TEGDMA ou então uma combinação do Bis-GMA, UDMA e TEGDMA na matriz orgânica de resina (García, Lozano, Vila, Escribano e Galve, 2006).

Podemos ainda encontrar na matriz orgânica aditivos como por exemplo iniciadores, co-iniciadores, inibidores, pigmentos, entre outros.

Quanto aos **iniciadores** depende se a resina composta é activada por meio de luz ou se é activada quimicamente. No caso das resinas fotopolimerizáveis estas são activadas por meio de uma luz na região do azul (comprimento de onda de cerca de 470nm) que é absorvida normalmente por um foto-iniciador, como por exemplo a canforoquinona (CQ) (absorve comprimento de onda entre os 400 e os 500nm), que é adicionado à matriz em pequenas quantidades, que variam de 0.2 a 1%. Esta reacção é acelerada pela presença de amins orgânicas, como é o caso do dimetilamino etil metacrilato (DMAEMA), que também é encontrada em níveis baixos cerca de 0.15% (Rawls & Whang, 2012a).

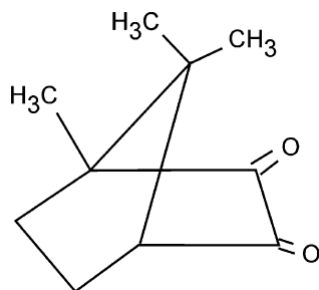


Figura 9: Estrutura química da canforoquinona (Volk et al., 2009)

Nas resinas auto-polimerizáveis, temos duas pastas, uma contém o iniciador que é o peróxido benzoílo e outra contém o activador que é uma amina terciária aromática. Quando estas duas pastas entram em contacto, a amina reage com o peróxido benzoílo produzindo radicais livres promovendo assim a polimerização (Rawls & Whang, 2012a).

São também adicionados **inibidores** para prevenir ou minimizar a polimerização espontânea. O inibidor que normalmente é adicionado às resinas é o hidroxitolueno butilado (BHT) que é utilizado em concentrações de 0.01% em peso. Os inibidores têm

duas funções: assegurar um tempo de trabalho adequado e prolongar o tempo de armazenamento das resinas. Além disso, estes componentes apresentam um grande potencial de reactividade para consumir os radicais livres (Rawls & Whang, 2012a).

Para que os compósitos apresentem uma aparência natural, o mais semelhante ao dente são adicionados pigmentos como é o caso de óxidos inorgânicos. São também colocados absorventes ultra-violeta (UV) que mimetizam alterações de cor causadas pela oxidação (Powers & Sakaguchi, 2006b).

2.1.2 Partículas de Carga

A incorporação de partículas de carga nas resinas compostas tem como objectivo melhorar as propriedades físico-químicas das resinas. Estas partículas consistem essencialmente em quartzo, sílica, vidro ou cerâmicas que contém metais pesados como o bário, estrôncio e zircónio. Uma das classificações usadas para as resinas compostas é ter em conta o tamanho e o tipo de partículas. Além disso, o tamanho e a distribuição das partículas de carga são decisivas nas características físicas e mecânicas das resinas compostas. Normalmente estas partículas representam cerca de 30-70% do volume ou 50-85% em peso do compósito, mas esta quantidade pode variar de resina para resina (Schmalz, 2009b).

Este tipo de partículas vai permitir uma melhoria das propriedades das resinas compostas, uma vez que vão reforçar as resinas, reduzem a contracção de polimerização, reduzem a expansão e contracção térmica, controlam a viscosidade, diminuem a absorção água e conferem-lhe radiopacidade (Rawls & Whang, 2012a).

2.1.3 Agente de União

Para que um compósito apresente propriedades mecânicas adequadas, é essencial que a matriz orgânica de resina esteja firmemente ligada às partículas inorgânicas. Esta ligação química é formada por agentes de acoplamento que podem ser titanatos, zirconatos e organosilanos tal como γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (γ -MPTS), sendo este último o mais utilizado (Rawls & Whang, 2012a).

A aplicação de um agente de acoplamento adequado nas resinas pode conferir uma melhoria das propriedades físicas e mecânicas das resinas e permitir uma estabilidade

hidrolítica que vai prevenir a penetração de água na interface entre a matriz e as partículas de carga (Freire et al., 2012).

2.2 Propriedades das resinas compostas

2.2.1 Grau de Conversão e Monómeros Residuais

A fotopolimerização dos monómeros da matriz consiste na abertura das ligações duplas dos resíduos metacrilatos dos monómeros e resultam num processo de ligações cruzadas. Idealmente, todos os monómeros das resinas compostas deveriam ser convertidos a polímeros durante o processo de polimerização (Obradović-Djuričić, Medić, Radišić & Laušević, 2011). No entanto, a conversão dos monómeros normalmente nunca é completa, ou seja, existem ligações duplas que não reagem. Estas ou estão presentes em monómeros que são libertados para a cavidade oral (monómeros residuais), ou permanecem pendentes na cadeias (Sideridou, 2002; Gonçalves, 2008), tal como exemplificado na figura 10. A percentagem de ligações duplas de carbono que são convertidas em ligações simples de modo a formar a resina polimérica aquando da polimerização dá-se o nome de grau de conversão (Rawls & Whang, 2012a).

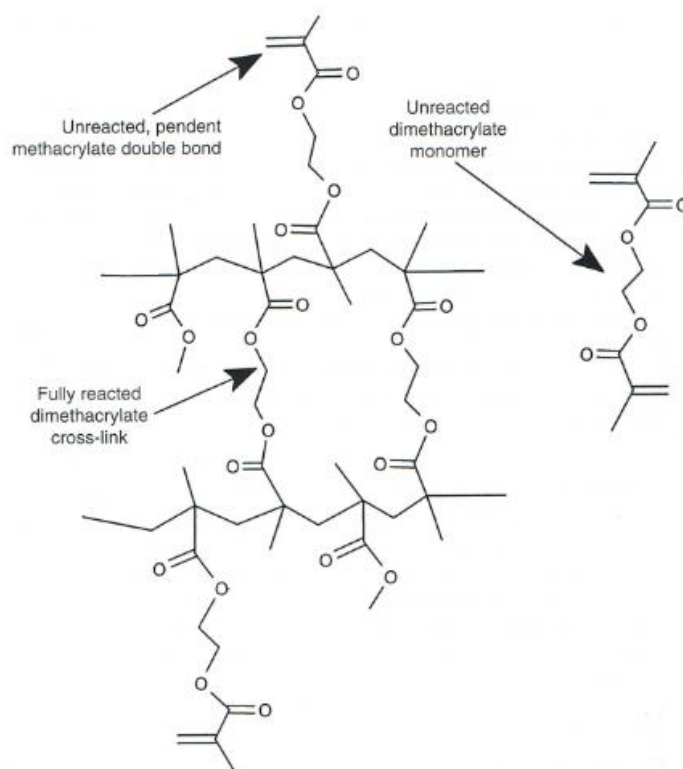


Figura 10: Grau de Conversão. Nesta figura podemos observar que as resinas quando são polimerizadas podem conter grupos metacrilatos com zero, uma ou duas ligações não ligadas. Se pelo menos uma das ligações reagiu, o grupo dimetacrilato encontra-se pendente na rede polimérica. Os grupos dimetacrilatos que não reagiram podem ser libertados das resinas compostas. (Rawls & Whang, 2012a)

O grau de conversão varia normalmente entre 35 a 77% dependendo do tipo de resina compostas e afecta muitas das suas propriedades, incluindo as propriedades mecânicas e físicas, solubilidade e degradação, estabilidade dimensional e a biocompatibilidade (Obradović-Djuričić et al., 2011). O grau máximo de conversão é atingido apenas 24 horas após a polimerização, o que significa que o grau de polimerização logo após a fotopolimerização pode ter valores inferiores, cerca de 30-40% (Van et al., 2011). O grau de conversão normalmente é menor na interface material/dente e na superfície livre do polímero. Esta está em contacto com oxigénio durante a reacção de polimerização o que vai produzir uma camada não polimerizada uma vez que tanto o oxigénio do meio ambiente como o que é absorvido pela superfície livre do polímero inibem a reacção de polimerização, o que faz com que o grau de polimerização diminua até valores de 20%. Além disso, esta superfície contém também formaldeído o que vai contribuir para a toxicidade celular (Seiss, Track, Hickel & Reichl, 2009b). Geralmente, quanto maior o grau de conversão de ligações duplas, maior a resistência mecânica (Sideridou et al., 2002). No entanto, quanto menor o grau de conversão maior a permeabilidade, a absorção de água, a solubilidade e consequentemente a libertação de monómeros residuais. (Gonçalves, 2008; Miletic, Santini & Trkulja, 2009).

O grau de conversão pode ser avaliado directamente ou indirectamente. A espectroscopia Micro-Raman e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) são os métodos directos normalmente utilizados para medir o grau de conversão. A avaliação das propriedades físicas, como por exemplo a rigidez e módulo de elasticidade, são métodos indirectos utilizados para avaliar a conversão de ligações duplas nos compósitos (Obradović-Djuričić et al., 2011).

O grau de conversão das resinas depende de vários factores, tais como a estrutura química dos monómeros (monómeros mais flexíveis aumentam o grau de conversão), das condições da polimerização como atmosfera, temperatura, tempo de polimerização, intensidade da luz e da sua transmissão através do material e da concentração dos foto-iniciadores e inibidores presentes no compósito entre outros (Sideridou et al., 2002).

Podemos assim considerar que o grau de polimerização é um dos factores mais importantes que afecta o desempenho clínico das resinas (Obradović-Djuričić et al., 2011).

É importante diferenciar os termos de grau de conversão e monómeros residuais que são diluídos das resinas compostas. Os monómeros residuais são aqueles componentes que são libertados da resina para os vários solventes, que podem ser hidrófilos, hidrofóbicos, ou uma mistura de ambos (Schmalz, 2009b). Estes solventes penetram na rede polimérica, causando expansão ou aumento de volume, permitindo a difusão dos monómeros residuais. Cerca de 10% dos monómeros residuais podem ser libertados. Estas substâncias que são eluídas podem ser ingredientes dos compósitos, como por exemplo monómeros, inibidores, foto-iniciadores, ou então produtos de degradação. Os dois mecanismos que podem causar a libertação de substâncias são em primeiro lugar os monómeros não ligados (monómeros residuais) e/ou aditivos que são eluídos após a reacção de polimerização e em segundo lugar os componentes que são libertados devido à degradação ou erosão dos materiais ao longo do tempo (Gonçalves et al., 2009).

Nos testes *in vitro* que são realizados para analisar a natureza e quantificar as substâncias que são libertadas das resinas compostas, estas dependem do solvente a que são expostos e do método analítico utilizado (Sideridou et al., 2005).

Vários meios de eluição (solventes) podem ser usados para incubar as substâncias e podem ser divididas em dois grupos: i) água ou misturas aquosas (meios de cultura de células, saliva artificial ou humana), ii) soluções orgânicas à base de etanol ou metanol. Há uma maior libertação de substâncias com solventes orgânicos do que em água e misturas aquosas, como podemos verificar na figura 11 (Gupta, Saxena, Pant e Pant, 2012). A solução de 75% etanol e água é utilizada em vários estudos, pois é onde se verifica uma maior diluição dos monómeros. É recomendada pela Food and Drug Administration (FDA) Guidelines of the USA (1976, 1988), como um estimulador de comida e pode ser considerado clinicamente relevante (Fano et al., 2007). Esta simula a influência de certas bebidas (incluindo alcoólicas), vegetais e frutas. No entanto, o etanol a 75% é normalmente caracterizado como um meio agressivo (Fano et al., 2007).

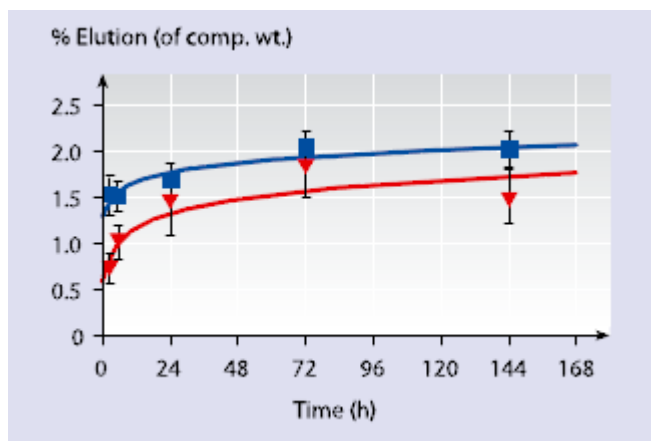


Figura 11: Libertação cumulativa de componentes a partir de um compósito à base de resina em percentagem do peso da amostra de compósito. ▼ - Na água, ■ - Numa mistura de 75% de etanol e 25% de água. (Schmalz, 2009b)

Existem vários métodos analíticos utilizados para a determinação das substâncias que são eluídas das resinas compostas, sendo o mais comumente utilizado o da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Sideridou & Achilias, 2005). Mas existem outros como é o caso da cromatografia gasosa, espectrofotometria de fluorescência. Se necessário, estes métodos podem ser combinados com espectroscopia de massa (Sideridou et al., 2005).

De acordo com Ferracane, são vários os factores que podem influenciar a eluição das resinas. Em primeiro lugar a quantidade de componentes que é libertada está directamente relacionada com a extensão da reacção de polimerização (isto é com o grau de polimerização) e com as condições em que esta foi realizada. Em segundo lugar, a natureza química do solvente tem um efeito significativo na eluição. Em terceiro, o tamanho e a natureza química dos componentes desempenham um papel importante nos componentes que são libertados. É de esperar que pequenas moléculas como o TEGDMA que tem uma mobilidade mais elevada sejam eluídos mais rapidamente do que os monómeros com maior tamanho, como é o caso do Bis-GMA (Sideridou et al., 2005). Além disso, a composição (carga inorgânica) dos compósitos influencia directamente a eluição dos monómeros (Polydorou et al., 2009).

Vários autores investigaram a possível correlação entre o grau de conversão dos monómeros a polímeros que determina a estabilidade química e a solubilidade. Num estudo realizado por Pearson & Longman, estes mostraram que a redução da intensidade de radiação na fotopolimerização aumenta a solubilidade. Segundo Tanaka *et al.*

mostrou que o aumento da intensidade da luz e do tempo de polimerização de 30 para 50s resultou numa redução significativa dos monómeros residuais e da quantidade de componentes que eram libertados para a água. Pelo contrário, Ferracane encontrou uma pobre correlação entre o grau de conversão e a solubilidade (Polydorou et al., 2009). Podemos então concluir que devido às diferenças que existem na composição dos monómeros e na densidade da rede polimérica, não é possível prever com precisão a eluição dos diferentes compósitos tendo em conta o grau de conversão (Obradović-Djuričić et al., 2011).

Os monómeros que não reagiram e que estão penderes na resina podem afectar negativamente o desempenho clínico dos compósitos uma vez que este fica mais susceptível à oxidação e à degradação hidrolítica, que pode manifestar-se pela descoloração da resina e acelerar o seu desgaste (Sideridou et al., 2005). Além disso, a eluição dos componentes da resina depende da composição das resinas compostas. As diferentes substâncias que são libertadas das resinas, como é o caso dos monómeros residuais, aditivos e produtos de degradação, podem provocar irritação dos tecidos moles, estimular o crescimento de bactérias e promover reacções alérgicas (Sideridou et al., 2005).

A libertação de substâncias das resinas compostas tem sido amplamente estudada. Geurtsen et al., avaliou a libertação de substâncias dos materiais de restauração e qual o seu efeito citotóxico nos fibroblastos. Spahl et al., identificou quais os monómeros e aditivos que são libertados dos compósitos. Vários estudos *in vitro* mostraram que os monómeros que são libertados podem provocar efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagénicos ou estrogénicos na polpa e reacções alérgicas ou inflamatórias nos tecidos adjacentes aos materiais dentários como é o caso das células da mucosa oral/gengival (Polydorou et al., 2009).

Nestes últimos anos, observou-se um aumento de casos de dermatite alérgica de contacto e de asma nas pessoas expostas a estas substâncias. Estão também descritas na literatura outras reacções, que são menos comuns, como é o caso do líquen plano (local), gengivite, ulcerações, eczema e eritema (Durner et al., 2010).

Na literatura, existem muitos estudos sobre a libertação dos monómeros e mostram que estes componentes podem ser potencialmente perigosos, podendo desencadear efeitos locais ou até mesmo sistémicos. Para além do potencial alérgico dos monómeros, vários

componentes das resinas têm mostrado ter efeitos citotóxicos, mutagénicos e genotóxicos e há também suspeitas de toxicidade no sistema reprodutor. Além da identificação dos perigos, a avaliação do risco de toxicidade requer um conhecimento preciso das quantidades e do tipo de componentes libertados (Van Landuyt, et al., 2011).

O TEGDMA é um dos monómeros mais utilizados nas resinas, sendo considerado o monómero que é mais libertado deste tipo de materiais (Krifka et al., 2011). A sua libertação pode ser por meio de duas vias, a primeira é através dos túbulos dentinários para a polpa, podendo esta libertação mesmo chegar aos 60%, porém a dentina desempenha função de barreira levando à diminuição da libertação deste monómero. A segunda via é através da superfície da restauração para a cavidade oral, permitindo que os monómeros sejam eluídos na saliva entrando assim em contacto com os tecidos mucosos (Obradović-Djuričić et al., 2011). Vários estudos comprovaram que este monómero pode ser citotóxico para a polpa e para os fibroblastos gengivais humanos, alergénico ou genotóxico para as células (Seiss, Langer, Hickel & Reichl, 2009a), tendo assim a capacidade de induzir micronúcleos e mutações nas células de mamíferos, bem como deleções no genoma dos fibroblastos V79 de hamsters chineses (Arossi, Lehmann, Dihl, Reguly & Andrade, 2010). Foi descrito que pode induzir apoptose *in vitro* (Michelsen, Moe, Strøm, Jensen & Lygre, 2008). Além disso, pode estar associado com a diminuição da glutathione (GSH) intracelular, pois afecta a actividade da glutathione transferase P1 (GSTP1) dos fibroblastos, levando assim ao aumento das espécies reactivas de oxigénio (ROS) causando *stress* oxidativo (Michelsen et al., 2008). Por último, o TEGDMA pode ainda promover a proliferação de importantes microrganismos cariogénicos como o *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus sobrinus* de forma dependente do pH (Sideridou et al., 2005).

O HEMA devido ao seu baixo peso molecular e teor hidrofílico, pode difundir-se através da dentina, podendo afectar a divisão celular e actividade dos odontoblastos (Çetingüç, Ölmez & Vural, 2007). Além disso, pode induzir apoptose das células, pois provoca alterações na composição da superfície celular pela activação dos genes envolvidos na apoptose e activação das endonucleases que provocam fragmentação do DNA (Obradović-Djuričić et al., 2011).

Foram realizados vários estudos *in vitro* e verificaram que o UDMA leva a perturbações no ciclo celular das células do carcinoma epidermal oral e nos fibroblastos do prepúcio de seres humanos, podendo ainda comprometer a acção das células imunocompetentes da polpa de ratos (Poplawski et al., 2010). Por outro lado, o UDMA que é libertado dos materiais dentários pode atingir níveis tóxicos nas células, podendo assim provocar necrose celular, mas o seu mecanismo de citotoxicidade permanece ainda desconhecido (Poplawski et al., 2010).

O BHT é um aditivo antioxidante amplamente utilizado nos materiais de restauração. Foram realizados vários testes de modo a analisar a actividade biológica desta substância e foi demonstrado que provoca toxicidade hepática nos ratos, quando era administrada oralmente e regulava a resposta alérgica tanto *in vitro* como *in vivo* (Seiss et al., 2009a).

O 4 - (dimetilamino) - o ácido benzóico etil éster (DMABEE) é um dos co-iniciadores utilizado nas resinas compostas e que pode ser libertado devido a processos de degradação da resina. Este apresenta um efeito citotóxico moderado e devido ao seu teor lipofílico pode acumular-se nas membranas celulares afectando a sua integridade (Seiss et al., 2009a).

2.2.2 Absorção de água e solubilidade

Absorção de água é um processo gradual e pode levar a uma degradação, comprometendo as propriedades químicas e mecânicas das resinas compostas, devido à hidrólise, solubilidade e aumento de volume, libertação dos monómeros residuais e de produtos de degradação e perda de adesão entre a matriz polimérica e as partículas de carga (Gonçalves et al., 2008; Park, Ye, Topp, Misra & Spencer, 2009), interferindo ainda na estabilidade da cor dos compósitos e na resistência ao desgaste (Noort, 2007).

São vários os factores que determinam a extensão pela qual o material é afectado pelo ambiente aquoso, como é o caso das características químicas e estruturais da rede polimérica. As características químicas incluem o teor hidrofílico do polímero, que depende da natureza química dos monómeros e da ligação que estes estabelecem após polimerização, e das diferentes solubilidades entre o polímero e o solvente. Os parâmetros estruturais incluem a densidade de ligações e a porosidade da rede polimérica. A qualidade e a quantidade de ligações que se formam durante a

polimerização, também determinam a quantidade de água que é absorvida e o aumento de volume que pode ocorrer quando os materiais são imersos nos solventes (Ferracane, 2006).

A absorção intrínseca de água é cerca de $40\text{-}45\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$, mas alguns compósitos podem ter valores superiores. Para além dos factores enunciados anteriormente, existem ainda outros factores que podem explicar estas diferenças nos valores de absorção entre as resinas. Por exemplo, após a fotopolimerização das resinas há a formação de uma densa rede polimérica, mas como o grau de polimerização nunca é completo, podem se formar espaços que permitem que a água se dissolva. Além disso, estes espaços podem ser também introduzidos na resina durante a colocação. Outra possibilidade é caso haja uma ruptura hidrolítica da adesão entre a matriz e as partículas de carga, vai haver uma exposição das partículas de carga à superfície da resina, fazendo com que as partículas de carga percam a sua eficácia resultando numa rápida deterioração e num elevado grau de desgaste (Noort, 2007).

Um estudo realizado por Venz e Dickens, analisaram as diferenças de absorção de água por diferentes redes poliméricas constituídas por vários monómeros a longo prazo (durante 6 meses) e concluíram que a absorção de água era da seguinte ordem TEGDMA > Bis-GMA > UDMA > HMDMA (Ferracane, 2006). Outros estudos, baseando-se de que absorção de água depende da natureza química dos monómeros, mostraram que as resinas que apresentam Bis-GMA exibem maior absorção de água em comparação com as resinas à base de uretano, e menor absorção do que as resinas que contêm bisfenol A dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA), porque não têm grupos hidroxilo do Bis-GMA ou ligações uretano do UDMA (Ferracane, 2006).

Uma das consequências da absorção de água das resinas é seu aumento de volume, isto porque há difusão do solvente na rede polimérica e separação das cadeias, criando assim expansão. Esta expansão, num material rígido como é o caso das resinas, pode provocar *stress* na interface entre a restauração e o dente, podendo ocorrer a sua separação. Esta alteração na dimensão das resinas é complexa e difícil de antever e depende do tipo e constituição do material (Ferracane, 2006).

O estudo da absorção de água e da solubilidade dos materiais é importante para compreender o comportamento a longo prazo dos materiais, uma vez que a absorção de água promove uma variedade de processos químicos e mecânicos que criam

preocupações biológicas assim como a produção de efeitos adversos na estrutura e função da matriz polimérica (Park et al., 2009).

2.2.3 Biodegradação das resinas compostas

Biodegradação pode ser definida como as alterações que ocorrem nas propriedades químicas, mecânicas e físicas devido às condições orais a que os materiais são expostos, na qual ocorre a separação das cadeias poliméricas da matriz e formação de oligômeros e finalmente monómeros (Bettencourt et al., 2010). A degradação química na cavidade oral ou biodegradação está associada a vários mecanismos, incluindo a hidrólise química que pode ser estimulada por preparações salivares e pelas alterações de pH, degradação enzimática por hidrólise ou oxidação (Santerre, Shajii & Leung, 2001).

Na cavidade oral os materiais estão expostos tanto a substâncias endógenas (proteínas, enzimas, polissacáridos, bactérias) como a exógenas, que são todos os componentes que provêm da alimentação, como é o caso de ácidos, sais, álcoois, oxigênio, entre outros (Bettencourt et al., 2010). Como exemplos de substâncias endógenas temos a saliva, no qual o componente major é a água, apresentando também histaminas, estaterinas, lisozimas, proteínas ricas em prolina, anidrases carbônicas, amílases, proxiadases, lactoferrina, mucina e IgA. Estas substâncias endógenas têm como função tamponização, digestão, lubrificação, protecção dos tecidos, mineralização e acção anti-viral e antibacteriana (Ferracane, 2006).

A biodegradação dos materiais é um processo complexo no qual componentes da saliva, como as enzimas, podem estabelecer interações com os materiais levando a alterações nas suas propriedades, comprometendo a sua função. Pode mesmo levar à libertação de componentes como os monómeros, que vão induzir respostas biológicas nas células e nos tecidos (Bettencourt et al., 2010). As enzimas salivares podem provocar a degradação dos polímeros através do ataque às cadeias laterais, produzindo produtos que são prejudiciais assim como deterioração das propriedades da rede polimérica (Bettencourt et al., 2010). As esterases que são um grupo de enzimas presentes na saliva pode levar à esterificação dos metacrilatos, ou seja catalisam a degradação dos monómeros (Ferracane, 2006). Freud e Munkgaard (1990) mostraram que a degradação enzimática das resinas provoca alterações nas propriedades mecânicas das resinas

manifestando-se por uma redução da dureza da superfície e da resistência ao desgaste (Santerre, Shajii & Tsang, 1999).

O principal factor que determina a extensão de degradação das resinas é a natureza química dos monómeros que constituem a rede polimérica, o que pode ser comprovado por estudos que demonstraram que as resinas Bis-GMA/TEGDMA modificadas pelo uretano são mais resistentes do que resinas Bis-GMA/TEGDMA não modificadas (Ferracane, 2006). Outros estudos mostraram também que o TEGDMA é mais susceptível à degradação hidrolítica pelas enzimas do que o Bis-GMA ou Bis-EMA, enquanto que o Bis-GMA é mais rapidamente degradado do que o UDMA (Hagio, Kawaguchi, Motokawa & Miyazaki, 2006). Pode estar ainda relacionada com o grau de polimerização (Ferracane, 2006).

Os estudos que têm sido realizados ainda não estabeleceram os tipos ou o nível mínimo de enzimas necessário para induzir tal degradação, que difere de individuo para individuo, mas mostraram que a saliva contém esterases que são capazes de degradar as resinas compostas (Santerre et al., 2001).

As duas enzimas que são mais utilizadas nos estudos *in vitro* para analisar a degradação são a pseudocolinesterase (PCE) e a colesterol esterase (CE). Estes produtos foram detectados apenas alguns dias após o contacto dos monómeros com as enzimas (Hagio et al., 2006). No entanto, é importante ter em conta que nem todas as esterases apresentam a mesma especificidade para os diferentes monómeros. Actividade hidrolítica das esterases é estrutura-dependente. A diferença de acção entre a PCE e a CE pode estar relacionado com as diferentes reactividades com os substratos naturais e sintéticos. No caso dos monómeros, os estudos cinéticos demonstraram que PCE hidrolisa preferencialmente o TEGDMA em relação ao Bis-GMA, enquanto que CE tem uma actividade hidrolítica 14 vezes maior para o Bis-GMA do que a PCE (Lin, Jaffer, Duff, Tang & Santerre, 2005).

Vários estudos *in vitro* têm sido realizados para analisar os produtos de degradação que são libertados pelas resinas, sendo os principais o ácido metacrílico e o formaldeído. Oysaed et al., realizaram um estudo onde analisaram várias resinas compostas, em particular a libertação de formaldeído quando estas eram imersas em água, utilizando HPLC e espectroscopia ultravioleta. Eles sugeriram que existiam dois mecanismos que levavam à formação do formaldeído. Pode existir uma oxidação dos grupos metacrilato

insaturados na presença de ar, o que resultava em monómeros não ligados e ligações duplas pendente do polímero. Assim como, a decomposição de um co-polímero alternado por metacrilato e oxigénio, que é formado no início da polimerização, pode levar à formação de formaldeído. O nível de formaldeído libertado pode ser uma fonte possível para desencadear reacções alérgicas (Santerre et al., 2001). O ácido metacrílico é um produto que resulta da degradação, por exemplo, do HEMA e do TEGDMA, que pode ser libertado por meio da via metabólica da valina assim como pela activação biológica por meio da epoxidação (Seiss et al., 2009b).

Foi também demonstrado que pode ocorrer uma interacção entre as bactérias e a rede polimérica. Segundo um estudo *in vitro* realizado por Willershausen et al., mostraram que através da colonização das bactérias na superfície dos materiais, devido à sua rugosidade, elas podem produzir ácidos contribuindo assim para a degradação da superfície dos materiais (Bettencourt et al., 2010).

Durante a exposição do material na cavidade oral, outro factor que pode contribuir para a sua degradação é por fadiga, ou seja, a exposição do material a forças cíclicas (repetitivas) de pequena intensidade, como é o caso das forças de mastigação. A aplicação contínua destas forças leva a uma degradação progressiva e a formação de fendas, podendo levar ao insucesso da restauração (Bettencourt et al., 2010).

O tipo de dieta que o indivíduo apresenta pode contribuir para as alterações da temperatura da cavidade oral, o que leva a um ambiente adverso, pois as restaurações apresentam diferentes coeficientes de expansão térmico em relação ao dente o que vai induzir *stress* na superfície da restauração. Este *stress* induzido pelas variações de temperatura podem levar a falhas e diminuir a força de adesão entre a restauração e o dente, contribuindo assim para a degradação do material. Também os alimentos e bebidas utilizadas pelos indivíduos provocam alterações no pH da cavidade oral, e consequentemente alterações nos materiais dentários (Bettencourt et al., 2010).

A principal consequência, de interesse clínico, da biodegradação é a libertação de componentes das resinas compostas, como os monómeros não ligados/não polimerizados e/ou aditivos, que podem apresentar potencial tóxico para os tecidos circundantes e não só. Além disso, a biodegradação pode provocar alterações na estabilidade das resinas, nomeadamente nas suas propriedades mecânicas e químicas dos materiais, podendo comprometer a sua função (Bettencourt et al., 2010).

3. TOXICOLOGIA MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS LIBERTADAS PELAS RESINAS COMPOSTAS.

3.1 Toxicidade Sistémica

Como já mencionamos anteriormente nenhum material é 100% biocompatível, ou seja, quando este é colocado no local de acção vai entrar em contacto com os tecidos adjacentes e vão-se estabelecer interacções, que podem induzir efeitos tóxicos, tanto sistémicos como locais (Wataha, 2012).

Estes efeitos sistémicos dependem essencialmente das substâncias que são libertadas, como os monómeros não ligados resultantes dos processos de degradação dos materiais dentários, e ainda pelas substâncias formadas resultantes da degradação dos monómeros. São diversas as vias pelas quais estas substâncias podem entrar no organismo incluindo a ingestão ou absorção, inalação de vapores, microfiltração através do ápex, absorção através da mucosa, entre outras, e podem consequentemente atingir várias zonas do organismo visto que entram na corrente sanguínea. A resposta sistémica do organismo a estas substâncias depende da sua concentração, do tempo de exposição e da capacidade de excreção dos monómeros (Anusavice, 2012).

Normalmente a toxicidade sistémica é determinada pela Dose Letal 50% (DL50), corresponde à dose de uma substância química que provoca a morte de 50% de uma população testada (Anusavice, 2012). A toxicidade sistémica de alguns dos monómeros que constituem as resinas compostas estão enunciados na tabela 1.

Substância	LD50 [mg/Kg(rats)]
Bis-GMA	>5000
UDMA	>5000
TEGDMA	10837
Bisfenol A	3250
HEMA	5888

Tabela 1: Toxicidade sistémica dos monómeros que constituem as resinas compostas (Schmalz, 2009b)

São raros os estudos disponíveis na literatura no que diz respeito à toxicidade sistémica provocada pelos materiais de restauração à base de resina. Os testes que avaliam este tipo de toxicidade são mais relevantes na avaliação de novos materiais, antes de serem

colocados no mercado, não apresentam tanta relevância clínica para os profissionais dentários, ao contrário dos efeitos tóxicos locais (Anusavice, 2012).

A estrogenicidade induzida por certas substâncias químicas provoca uma reacção biológica semelhante à produzida pela hormona estrogénio que é produzida pelo organismo. O material apresenta estrogenicidade, quando têm a capacidade de se ligar aos receptores das hormonas esteróides, provocando alterações no funcionamento normal endócrino (Moharamzadeh et al., 2009).

3.2 Toxicidade Local

A toxicidade local resulta da interacção química que é estabelecida entre uma substância tóxica, como por exemplo os monómeros de resina, e as moléculas biológicas (Schmalz, 2009a).

No caso dos materiais dentários, os monómeros que são libertados, podem difundir-se através dos túbulos dentinários ou serem dissolvidos pela saliva e assim atingirem os tecidos adjacentes aos materiais como é o caso da polpa, ligamento periodontal e mucosa oral, em particular da gengiva, tal como podemos observar na figura 12. Estas substâncias podem acumular-se nestes tecidos e atingir elevadas concentrações que levam à modificação das propriedades biológicas dos mesmos. Estes efeitos locais dependem de vários factores, tais como a capacidade de difusão das substâncias libertadas, da sua concentração e do tempo de exposição (Anusavice, 2012).

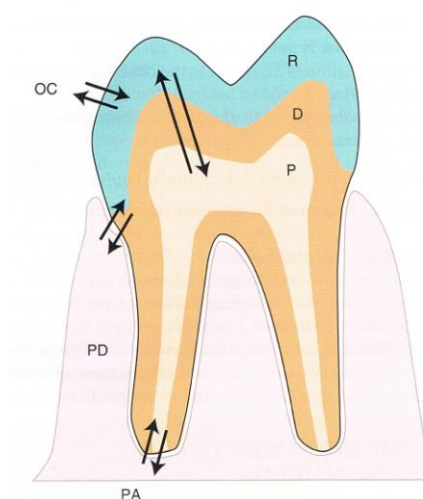


Figura 12: Tecidos que podem ser atingidos pelas substâncias que são libertadas, devido à degradação dos materiais de restauração (R). Podem ser libertados para a cavidade oral (OC), dentina (D), para a câmara e tecido pulpar (P), periodonto (PD) e para os tecidos periapicais e osso (PA) (Anusavice, 2012).

3.2.1 Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade, Estrogenicidade

Nestes últimos anos foram introduzidos no mercado uma grande variedade de materiais dentários e um dos seus requisitos é que sejam biocompatíveis para os tecidos adjacentes ao seu local de acção. Para os fabricantes se assegurarem da sua biocompatibilidade são realizados inúmeros testes *in vitro* e *in vivo* e os resultados mostraram que no caso das resinas compostas os monómeros podiam desencadear diversos efeitos em diferentes linhas celulares, estando implicados na hipersensibilidade e citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, estrogenicidade e alteração da resposta imunitária (Brackett et al., 2007).

A citotoxicidade é utilizada para descrever os mecanismos moleculares que interferem com a síntese macromolecular, que levam a dano celular funcional e estrutural (Murray, Lumley, Ross & Smith, 2000). Os estudos de citotoxicidade avaliam a morte celular provocada pelos materiais dentários. O tipo de linha celular que deve ser utilizada para a avaliação da citotoxicidade dos monómeros é controverso. Têm-se utilizado linhas celulares imortalizadas (fibroblastos 3T3, fibroblastos do pulmão do hamster chinês V79, queratinócitos HaCaT), assim como células primárias humanas que derivam da pele, gengiva, polpa ou periodonto e que apresentam variabilidade significativa quanto à sua sensibilidade (Martins, Leyhausen, Geurtsen & Volk, 2012). Após a avaliação da citotoxicidade dos componentes das resinas mostrou-se que a citotoxicidade não era igual para todos os monómeros. Foi também demonstrado que os monómeros bifuncionais, ou seja, que apresentavam dois grupos metacrilatos, eram geralmente mais citotóxicos do que os monómeros monofuncionais. (Schmalz, 2009a). Além disso, é influenciado essencialmente pelo peso molecular e lipofilicidade ou hidrofobicidade dos monómeros e do tamanho da cadeia (Reichl et al., 2006). Geurtsen et al. encontraram uma relação directa entre o peso molecular dos monómeros e a citotoxicidade, ou seja, quanto maior o peso molecular maior a citotoxicidade (Reichl et al., 2006).

Assim, podemos diferenciar os monómeros que apresentam citotoxicidade severa (Bis-GMA, UDMA e TEGDMA) dos que apresentavam citotoxicidade média (HEMA e CQ) (Martins et al., 2012). Na maioria dos estudos que avaliaram a citotoxicidade dos monómeros mostraram que a citotoxicidade era maior Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>>>HEMA (Bakopoulou, Papadopoulos & Gaarefis, 2009).

A citotoxicidade dos monómeros é expressa pela concentração tóxica mediana (TC₅₀) que define a concentração da substância química necessária para provocar redução de 50% de uma função biológica específica ou morte celular durante um determinado período de tempo (Schmalz, 2009b). A citotoxicidade alguns dos monómeros que constituem as resinas compostas estão enunciados na tabela 2.

Substância	TC ₅₀
Bis-GMA	9.35 µM
UDMA	17.4 µM
TEGDMA	124.5 µM
Canforoquinona	235 µM
Bisfenol A	28 µM
HEMA	3600 µM

Tabela 2: Citotoxicidade dos monómeros e iniciadores utilizados nas resinas compostas nos fibroblastos do rato (Schmalz, 2009b)

São vários os factores que contribuem para o aumento da citotoxicidade dos materiais dentários, dos quais se destacam as diferenças na composição química dos materiais, a concentração utilizada de material, a acção sinérgica que alguns estabelecem entre si, o conteúdo inorgânico da matriz de resina e ainda o grau de polimerização e o tempo de polimerização, entre outros (Martins et al., 2012).

Os monómeros também são genotóxicos. A genotoxicidade de uma substância é capacidade que esta tem para interagir com o genoma da célula. O DNA genómico é considerado uma molécula alvo dos componentes das resinas compostas e alguns testes *in vitro* podem verificar uma interacção directa entre os monómeros ou seus metabolitos e o DNA (Schweikl, Spagnuolo & Schmalz, 2006).

Mutagenicidade é definida pela capacidade de uma substância química induzir alterações permanentes e transmissíveis no DNA de uma célula. Estas alterações ou mutações podem envolver um único gene ou vários genes.

Existe ainda alguma controvérsia acerca da genotoxicidade/mutagenicidade provocada pelos monómeros. De acordo com Schweikl et al., não detectaram qualquer tipo de mutação induzida pelos monómeros Bis-GMA e UDMA. No entanto, Heil et al. mostraram que o Bis-GMA de certa forma provocava dano no DNA (Schweikl et al., 2006). Não foram igualmente detectadas quaisquer mutações em relação aos

monómeros HEMA. Contudo, Schweikl et al. (2006), mostrou que após a exposição a elevadas concentrações deste monómero verificava-se a formação de micronúcleos *in vitro*. Utilizando culturas de células de mamíferos verificou-se que o monómero TEGDMA provocava de forma dose-dependente efeitos mutagénicos nestas células confirmados pela formação de micronúcleos após a exposição a estes monómeros. Tanto o HEMA como o TEGDMA induzem a formação de quebras na cadeia de DNA confirmada pela visualização do DNA de células únicas inseridas em agarose, após electroforese (Schweikl et al., 2006).

3.2.2 Mecanismos moleculares

3.2.2.1 TEGDMA

O TEGDMA é um éster de etilenoglicol e α,β -ácido metacrílico insaturado (Geurtsen & Leyhausen, 2001). É um monómero que se encontra na matriz orgânica das resinas em concentrações que variam desde 25 a 50%, utilizado como diluente das resinas de modo a diminuir a sua viscosidade das resinas (Janke, Von Neuhoff, Schlegelberger, Leyhausen & Geurtsen, 2003). São numerosos os estudos que indicam que o TEGDMA é um dos principais componentes libertados das resinas (Volk, Leyhausen & Geurtsen, 2011) e devido à sua natureza lipofílica consegue penetrar no citosol e nas membranas lipídicas das células dos mamíferos, provocando assim efeitos tóxicos nestas células (Janke et al., 2003)

O TEGDMA é um dos principais alvos da hidrólise enzimática, no qual vão resultar produtos de degradação tóxicos, tais como o ácido metacrílico (MAA), formaldeído e 2,3- ácido epoximetacrílico (2.3-EMA), entre outros, esquematizados na figura 13 (Emmler et al., 2008). O 2,3-EMA apresenta efeitos citotóxicos semelhantes ao TEGDMA, enquanto que o MAA e o trietilenoglicol apresentam uma menor citotoxicidade (Bakopoulou et al., 2009).

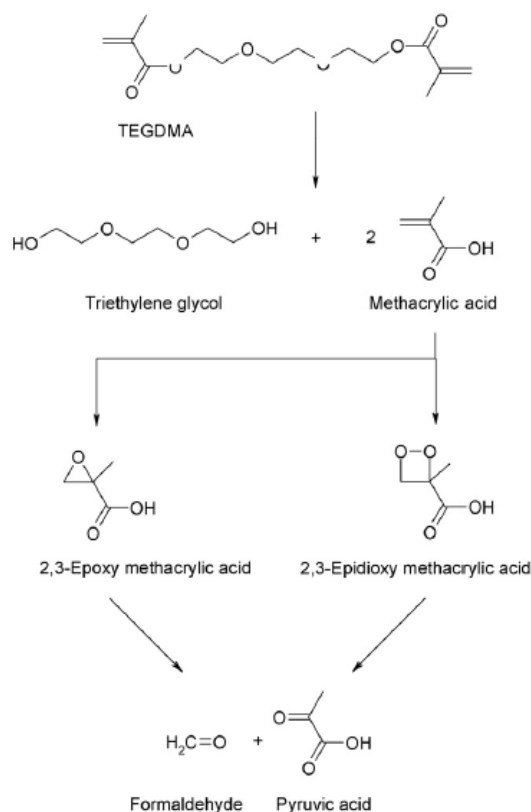


Figura 13: Metabolitos do ácido metacrílico durante a degradação do TEGDMA de acordo com Reich et al. (Emmler et al., 2008)

As células expostas ao TEGDMA, como é o caso dos fibroblastos gengivais e pulpares, produzem enzimas, que vão contribuir para a degradação dos materiais, mas a identidade dessas enzimas permanece desconhecida. Pensa-se que esta indução de enzimas é devido ao *stress* oxidativo e inflamação que os materiais provocam nas células (Gregson, Windsor & Platt, 2009). Foi demonstrado em vários estudos, tal como exemplificado na figura 14, que o TEGDMA pode ser libertado das resinas, através de processos de biodegradação ou sob a forma de monómeros residuais, entrando assim em contacto com os fibroblastos gengivais e pulpares. O TEGDMA que é libertado pode interagir com os fibroblastos, promovendo que estes libertem enzimas hidrolíticas que potenciam a degradação das resinas e consequentemente a libertação de mais monómeros e de outros produtos de degradação (Gregson et al., 2009).

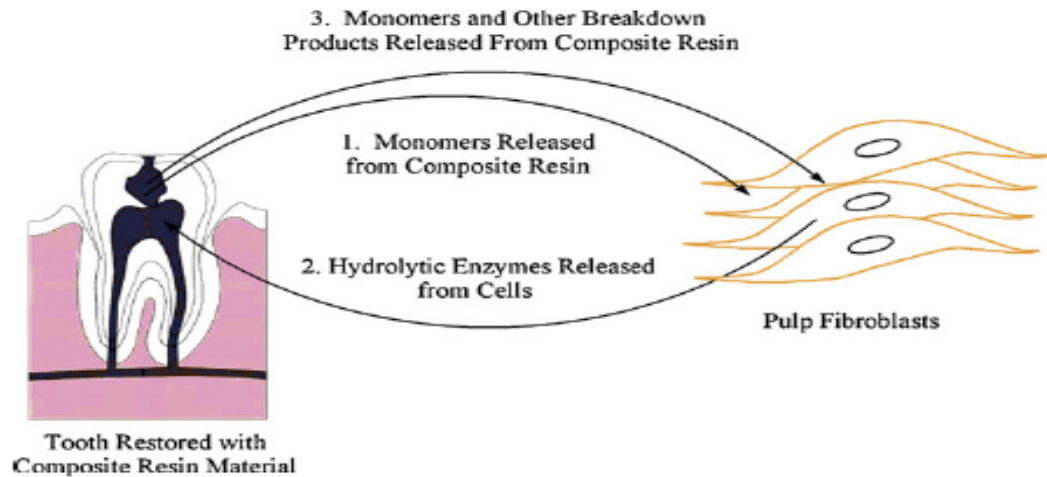


Figura 14: Interação entre as resinas compostas e os fibroblastos pulpares: (1) TEGDMA é libertado das resinas compostas para os tecidos circundantes. (2) Os fibroblastos, como resposta à libertação do TEGDMA, induzem a libertação de enzimas hidrolíticas que degradam as resinas. (3) Degradação das resinas leva à libertação de produtos de degradação pra os tecidos circundantes. (Gregson et al., 2009)

Vários estudos investigaram os mecanismos e as interações que os monómeros estabelecem. No caso do TEGDMA os estudos focaram-se em quatro efeitos: nas membranas, no metabolismo da glutathione e energético, DNA e nos componentes da matriz extracelular (Geurtsen et al., 2001). A figura 15 representa um esquema simplificado do efeito das interações do TEGDMA no metabolismo celular.

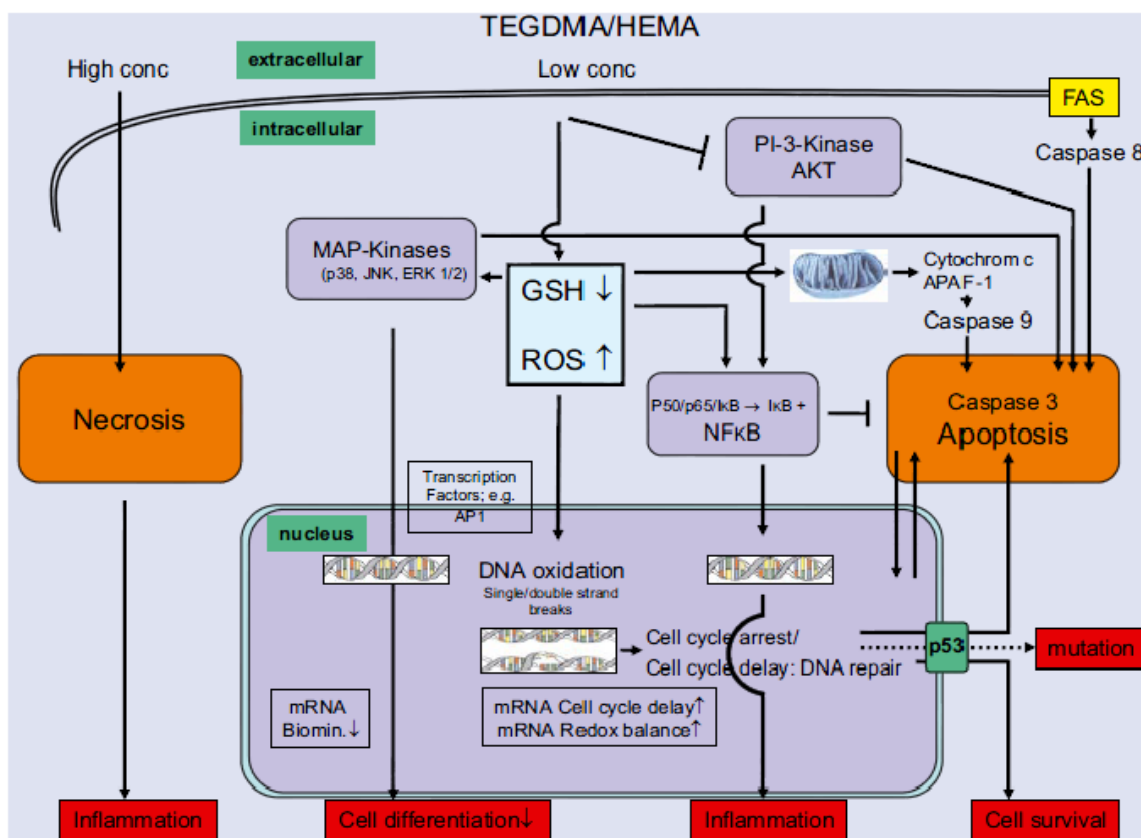


Figura 15: Esquema sobre a influência do TEGDMA no metabolismo celular (Schmalz, 2009b)

Vários estudos *in vitro* realizados em diferentes linhas celulares eucarióticas mostraram que o TEGDMA pode provocar efeitos citotóxicos, que dependem da concentração e do tempo de exposição a este monômero, genotóxicos/mutagênicos e teratogênicos (Volk et al., 2011).

São diversos os estudos que investigaram a citotoxicidade do TEGDMA, sendo esta avaliada essencialmente pelo método do MTT, descrito anteriormente, e também pelo método XTT utilizado por Reich et al. (2006) que concluíram que todos os monômeros incluindo o TEGDMA levam à diminuição da viabilidade celular (Bakopoulou et al., 2009). No teste XTT, as células metabolicamente activas, através das enzimas desidrogenases, conseguem reduzir o sal de tetrazólio XTT (amarelo) em formazan. A intensidade do corante quantificada espectrofotometricamente, é directamente proporcional ao número de células viáveis, ou seja, metabolicamente activas (Emmler et al., 2008). O mecanismo molecular, pelo qual o TEGDMA induz citotoxicidade ainda não está completamente esclarecido.

3.2.2.1.1 Efeito das espécies reactivas de oxigénio e da glutathione na toxicidade do TEGDMA

O TEGDMA pode reagir com nucleófilos intracelulares, como por exemplo enzimas com grupos sulfidrilo livres, glutathione reduzida, entre outros (Geurtsen et al., 2001).

A Glutathione (GSH) é um tripeptídeo e é uma das moléculas intracelulares do tipo tiol mais abundantes, apresenta baixo peso molecular e pode ser encontrada nas células dos mamíferos. Desempenha um papel importante na hemostase redox celular e está envolvida na desintoxicação celular. A GSH é uma molécula anti-oxidante, que protege as células contra os danos oxidativos provocados por xenobióticos e por substâncias metabólicas endógenas prejudiciais, como é o caso das espécies reactivas de oxigénio (ROS). Quando há desequilíbrio nos níveis dos sistemas anti-oxidantes, como o GSH, vitaminas, N-acetil-cisteína (NAC), a produção de ROS exceda a capacidade antioxidante das células, vai resultar no dano de macromoléculas celulares como lípidos, proteínas e DNA podendo mesmo levar à morte celular por apoptose (Martins et al., 2012). ROS podem ser formadas tanto endogenamente, nas mitocôndrias, nos peroxissomas e retículo endoplasmático pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), como exogenamente, como resultado da exposição à radiação ultra-violeta, radiação ionizante, tal como podemos observar na figura 16 (Schweikl et al., 2006).

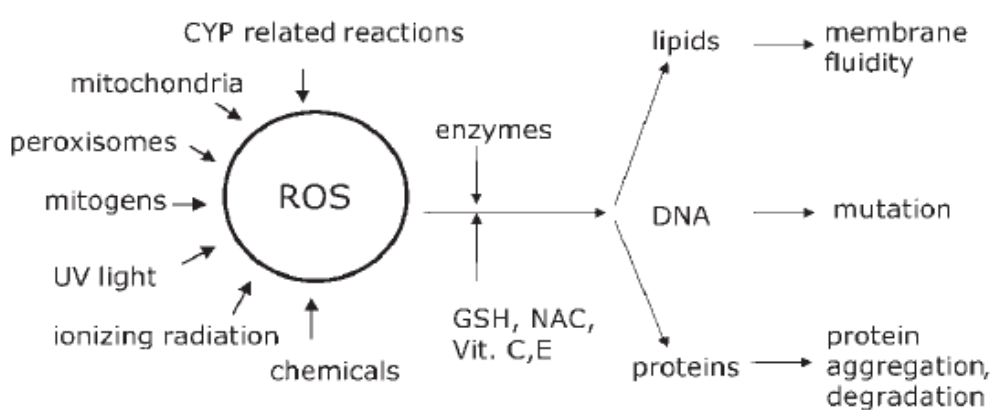


Figura 16: Produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e respostas celular. ROS pode ser formado tanto endogenamente como exogenamente. As substâncias anti-oxidantes funcionam como um sistema de defesa contra ROS. As macromoléculas celulares podem ser danificadas quando a produção de ROS excede a capacidade anti-oxidante das células. (Schweikl et al., 2006)

Estudos prévios revelaram que a diminuição do GSH pode levar a *stress* oxidativo e alteração nos componentes celulares importantes, assim como peroxidação das membranas celulares, modificação das vias de transdução de sinal ou dano DNA. Experiências recentes demonstraram que o TEGDMA pode ainda activar a apoptose em associação com uma diminuição acentuada de GSH (Volk, Engelmann, Leyhausen & Geurtsen, 2006).

A diminuição da GSH induzida pelo TEGDMA é uma reacção precoce, que pode ser observada 2-6h após o contacto com diferentes linhas celulares (fibroblastos gengivais e pulpares), que precede outras alterações citotóxicas (Volk et al., 2011). Vários estudos demonstraram este facto. Num estudo realizado por Engelmann et al., verificou-se uma diminuição precoce e significativa dos níveis intracelulares de GSH de 30-50% nas primeiras 2-6h de contacto dos fibroblastos primários gengivais humanos com o TEGDMA, mesmo em concentrações subtóxicas deste monómero (Volk et al., 2011). Freiding et al., também mostraram a diminuição do GSH nos hepatócitos do rato (Stanislowski et al., 2003). Também Stanislowski et al., observaram uma diminuição de GSH intracelular, seguido de um aumento dos níveis de ROS (Volk et al., 2011). Num estudo realizado por Volk et al. (2011), verificou-se uma rápida diminuição de GSH induzida pelo TEGDMA que estava associada a um moderado mas significativo aumento da formação de ROS durante as primeiras 4h de contacto. Após a análise dos resultados e de acordo com outros estudos realizados previamente por Noda et al e Walther et al., Volk et al. (2011), conclui que o aumento dos níveis de ROS durante o tratamento do TEGDMA pode ser devido à diminuição do GSH. No entanto, a forma como o TEGDMA, e outros metacrilatos, induzem a diminuição da GSH e o aumento do ROS e qual a sua natureza ainda não estão completamente esclarecidos (Volk et al., 2011). Como se regista apenas uma diminuição dos níveis de GSH, mas os níveis da glutathiona oxidada (GSSG) mantêm-se constantes, ou seja não aumentam, pensa-se que esta diminuição é devido a uma interacção directa entre o TEGDMA e o GSH e não devido ao seu consumo de modo a manter o balanço redox das células (pois neste caso teria havido um aumento da concentração do GSSG) (Schmalz, 2009b). O TEGDMA pode interagir directamente com a GSH através da reacção do tipo Michael levando à formação de um conjugado entre o TEGDMA/GSH, tal como podemos observar na figura 17 (Volk et al., 2006). Além disso, Lefeuvre et al. mostraram que o TEGDMA também altera a actividade da GSTP1, havendo uma diminuição da sua actividade nos

fibroblastos gengivais humanos (Bakopoulou et al., 2009). Estes resultados apoiam a hipótese de que o TEGDMA é um antagonista não competitivo da GSTP1e que o seu polimorfismo pode estar envolvido na susceptibilidade da citotoxicidade do TEGDMA (Bakopoulou et al, 2009).

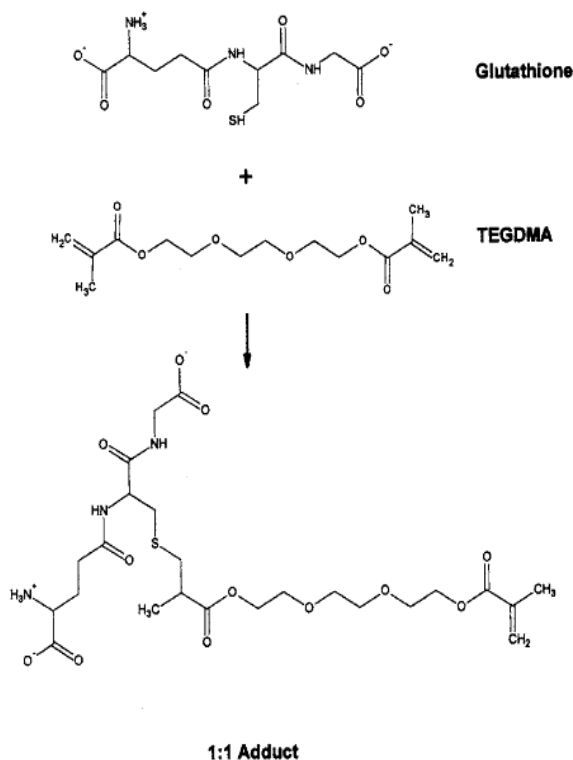


Figura 17: Reacção do tipo Michael proposta com uma redução da formação da glutathione levando à formação de um conjugado TEGDMA/glutathione (Martins et al., 2012)

Lefeuvre et al. mostraram que a diminuição da GSH pode ser acompanhada de peroxidação lipídica e dano mitocondrial, indicado pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial (Bakopoulou et al., 2009).

Foi demonstrado que os antioxidantes, como NAC, Trolox (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) podem diminuir ou prevenir os efeitos tóxicos induzidos pelo TEGDMA. Foram realizados estudos, onde incubaram inicialmente os fibroblastos humanos derivados do pulmão com antioxidantes, e após esta incubação estas células foram exposta ao TEGDMA e registou-se a diminuição dos níveis de GSH não era tão acentuada e ainda um aumento dos níveis da GSH redutase, contribuindo assim para uma diminuição dos efeitos citotóxicos do TEGDMA (Martins et al., 2012).

Os estudos que têm sido realizados de modo a quantificar as alterações nos níveis intracelulares de GSH após a exposição das células ao TEGDMA e consequentemente a sua citotoxicidade utilizam normalmente reagentes fluorescentes que reagem com a GSH e são posteriormente analisados espectrofotometricamente (Moharamzadeh et al., 2009). Um dos reagentes mais usados, tal como foi observado por Martins et al. (2012), para a determinação dos níveis de GSH é o *monobromobimane* (MBBr). Outros estudos realizados por outros investigadores tais como Engelmann et al. (2005) e Volk et al. (2006 e 2007) utilizaram este reagente para quantificar os níveis de GSH nos fibroblastos pulpares e gengivais humanos (Moharamzadeh et al., 2009). No entanto existem muitos outros. Num estudo realizado por Stanislawski et al. (2003) quantificaram os níveis de GSH nos fibroblastos gengivais e pulpares que foram expostos ao TEGDMA através de um derivado fluorescente, o *monochlorobimane* (mBCl) (Bakopoulou et al., 2009). Ainda outros autores utilizaram o reagente de Ellman's ou ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), como foi o caso de Walther et al. (2004), Noda et al. (2005) e Reichl et al. (2008). Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) é um indicador do *stress* oxidativo que normalmente é utilizado para quantificar os níveis de ROS após a exposição das células aos materiais dentários. Este reagente fluorescente é utilizado em inúmeros estudos dos quais se destacam o estudo de Engelmann et al. (2005), Schweikl et al (2003, 2008), Martins et al. (2012) (Moharamzadeh et al., 2009).

3.2.2.1.2 Indução Apoptose/Necrose pelo TEGDMA

Vários estudos mostraram que o TEGDMA que é libertado das resinas compostas pode migrar e atingir a polpa ou células gengivais e assim provocar morte celular, quer por apoptose ou por necrose.

Segundo Majno e Joris (1995), podemos distinguir dois tipos de morte celular, a apoptose e necrose (Janke et al., 2003). A apoptose é uma morte celular programada, dependente de energia, no qual as células diminuem de tamanho sem que haja perda da integridade da membrana. Pelo contrário, necrose é um processo patológico não controlado que não necessita de energia, no qual há um aumento do tamanho das células acompanhado de perda da integridade da membrana das células (Batarseh, 2011). A principal diferença entre estes dois processos, é que a necrose desencadeia um processo inflamatório, que resulta da libertação do conteúdo celular e dos produtos pró-

inflamatórios devido à ruptura da membrana celular, que se vão traduzir em sintomas clínicos, que levam frequentemente à formação de uma cicatriz (Janke et al., 2003). As principais diferenças entre a morte celular por necrose e por apoptose estão descritos na tabela 3 (Batareseh, 2011).

Apoptose	Necrose
<ul style="list-style-type: none"> • Processo controlado, estimulado fisiologicamente • Dependente de energia 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo não controlado, estimulado patologicamente • Processo passivo (não necessita de energia)
<ul style="list-style-type: none"> • Perda de volume das células 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento do volume das células (leva a lise celular)
<ul style="list-style-type: none"> • Não há perda da integridade da membrana 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda da integridade membranar
<ul style="list-style-type: none"> • Não-inflamatório 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamatório
<ul style="list-style-type: none"> • Fragmentação nuclear 	<ul style="list-style-type: none"> • Dissolução nuclear
<ul style="list-style-type: none"> • Individual ou pequenos grupos de células 	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes grupos de células

Tabela 3: Diferenças entre apoptose (morte celular programada) e necrose (morte celular patológica) (Batareseh, 2011)

A apoptose é um processo fisiológico e activo em que há utilização de energia. Na apoptose, há uma modificação das proteínas da superfície das células que são consequentemente removidas pelos macrófagos por fagocitose. Um factor importante que é necessário ter em conta quando estamos a avaliar a biocompatibilidade dos materiais, é que baixas concentrações de TEGDMA, provocam apoptose, enquanto que concentrações mais elevadas provocam necrose. Foi demonstrado num estudo realizado por Spagnuolo et al. (2004), que o TEGDMA em concentrações superiores a 3mM induzia necrose das células, ao contrário das concentrações mais baixas em que havia uma predominância de células apoptóticas (Batareseh, 2011). Existem essencialmente duas vias de sinalização celular que levam à morte celular por apoptose – a via membranar ou extrínseca, que envolve à activação de receptores membranares e a via intrínseca ou mitocondrial, tal como exemplificado na figura 18 (Ribeiro & Oliveira, 2008).

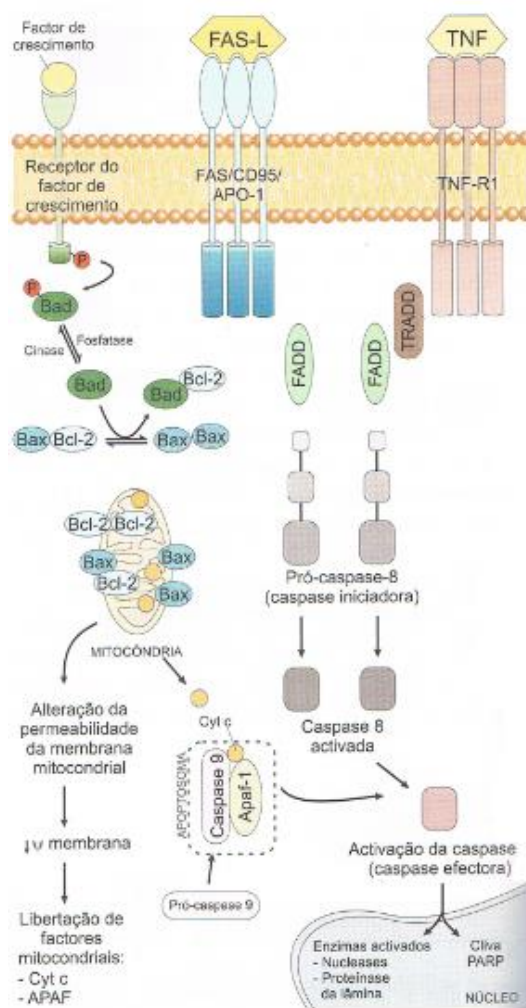


Figura 18: Principais vias bioquímicas envolvidas na apoptose celular (Ribeiro & Oliveira, 2008)

A via extrínseca ou membranar é desencadeada pela ligação de determinados ligandos a receptores membranares, que são proteínas transmembranares que pertenciam à família dos receptores factor de necrose tumoral (TNF) incluindo o TNF-R e o FAS/CD95. A activação destes receptores leva activação da caspase-8 no citoplasma iniciando-se assim o processo apoptótico. A caspase-8 vai promover a activação da caspase-3, que é considerada o verdadeiro executor da apoptose. A sua activação vai levar à inactivação de um factor inibidor da fragmentação do DNA, permitindo a sua clivagem por endonucleases específicas (Ribeiro & Oliveira, 2008).

A via intrínseca ou mitocondrial é desencadeada por sinais de activação de dentro da célula, que são desencadeados pelo *stress* intracelular como por exemplo dano no DNA, falta de factores de crescimento e o *stress* oxidativo (devido à produção de ROS) (Batareseh, 2011). A caspase-8 pode interagir com uma proteína que tem funções

inibidoras da apoptose, Bcl-2 que existe na membrana das mitocôndrias. Esta superfamília de proteínas que é constituída por várias proteínas que podem ter tanto funções pró-apoptóticas (promovem a morte celular) como anti-apoptóticas (Batarseh, 2011). O equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e das proteínas anti-apoptóticas vai determinar a susceptibilidade da célula e entrada em apoptose. A interacção entre a proteína Bcl-2 e com as proteínas pró-apoptóticas vai provocar uma alteração na membrana mitocondrial e consequentemente a libertação de factores mitocondriais, como por exemplo o citocromo c. O citocromo c é uma proteína que vai estimular a morte celular por apoptose. Esta proteína vai promover activação da caspase 9, que posteriormente activa a caspase-3 desencadeando a apoptose, por meio da fragmentação do DNA (Batarseh, 2011; Ribeiro & Oliveira, 2008).

Ambas as vias de apoptose levam à activação de caspases, que desempenham um papel importante na indução da apoptose. As caspases são enzimas proteolíticas intracelulares que vão provocar morte celular através da destruição de proteínas celulares que são essenciais para a viabilidade celular. Podemos dividir as caspases em iniciadoras que posteriormente activam as caspases efectoras, que continuam o processo de apoptose (Batarseh, 2011). Após a activação das caspases estas vão hidrolisar ou activar DNases que actuam sobre o DNA provocando a sua fragmentação (Ribeiro & Oliveira, 2008).

Existem outras vias que levam a apoptose das células, caso o DNA da célula esteja danificado, o núcleo da célula pode enviar sinais apoptóticos, como é o caso da activação da proteína p53 levando assim à eliminação destas células (Ribeiro & Oliveira, 2008).

De acordo com um estudo realizado por Janke et al. (2003), o TEGDMA causa principalmente uma morte celular por apoptose e este tipo de morte celular induzido às células gengivais primária humanas está dependente do tempo de exposição e da dose. Segundo Majno e Joris (1995), as células apoptóticas induzidas pelo TEGDMA entram são fagocitadas *in vitro* sem sinais de inflamação aguda e sem alterações tecidulares (Janke et al., 2003).

O *stress* oxidativo induzido pelos monómeros de resina como o TEGDMA podem desencadear o processo de apoptose, tal como Walther et al., demonstraram que a produção de ROS funciona como um sinal na activação de vias que controlam a sobrevivência celular e a morte celular através da activação de genes ou proteínas

antioxidantes (Batarseh, 2011). Por um lado, foi demonstrado que o TEGDMA em concentrações subletais provoca inicialmente uma diminuição da quantidade de GSH e um aumento da concentração de ROS, o que leva à morte celular por apoptose uma vez que há um aumento de expressão da proteína Bcl-2 e uma activação dos genes dependentes do factor nuclear kappa B (NF- κ B) e dano no DNA (Janke et al., 2003). Foi também demonstrado que o aumento de ROS induz a mitocôndria a produzir citocromo c que posteriormente vai promover a activação das caspases desencadeando assim processo de apoptose (Batarseh, 2011). Existem ainda outras teorias que dizem que a apoptose pode ser consequência da interrupção do ciclo celular ou através da via mitocondrial devido à activação das caspase-9. O aumento de ROS não é o único mecanismo que leva à morte celular por apoptose (Schmalz, 2009b).

São diversos os métodos que têm sido desenvolvidos para avaliar o tipo de morte celular que as células sofrem após o contacto com os materiais dentários. Nestes métodos pode-se incluir: o método de estudo da apoptose tendo como base o dano no DNA através da electroforese em gel de uma única célula, estudos da apoptose utilizando a Anexina V, estudos da actividade de proteases, como por exemplo as caspases, estudos que utilizam indicadores iónicos, estudos que usam os substratos de esterase, estudos que medem a proporção de ATP e ADP (Moharamzadeh et al., 2009). Destes estudos, o que é mais utilizado é o teste que utiliza a anexina V, que vai permitir a obtenção de dados qualitativos e quantitativos sobre os dois tipos de morte celular (Janke et al., 2003). Este método foi utilizado nos estudos de Janke et al. (2003) e de Spagnuolo et al. (2004), em que observaram os efeitos do TEGDMA nos fibroblastos gengivais e pulparens humanos (Moharamzadeh et al., 2009). Becher et al. (2006), Reich et al. (2006) e Samuelsen et al. (2007) utilizaram outro método que também permite a avaliação da morte celular, é o método Hoechst 33,342 que utiliza um corante que permite a determinação do conteúdo de DNA das células através da intensidade fluorescência (Moharamzadeh et al., 2009). Krifka et al. (2011) realizaram um estudo em macrófagos de rato RAW264.7 e utilizaram o corante de iodeto de propídio (PI) para distinguir as células que sofriam apoptose das que sofriam necrose. Neste método utilizando o corante PI, este só consegue entrar nas células caso a sua membrana esteja comprometida, devido a substâncias tóxicas. Após entrar nas células o PI intercala-se com o DNA e com o RNA. O número de células coradas corresponde às células que

sofreram morte celular que vão ser quantificadas através de citometria de fluxo (Moharamzadeh et al., 2009).

Foram muitos os estudos que demonstraram que o TEGDMA tinha capacidade de induzir apoptose nas células primárias da polpa e nos fibroblastos, no entanto o mecanismo molecular e as vias de transdução de sinal ainda não estão completamente esclarecidos, sendo necessário mais estudos de modo a esclarecer quais os efeitos do processo apoptótico no tecido pulpar (Batareseh, 2011).

3.2.2.1.3 Dano no DNA e Regulação do Ciclo Celular

O DNA genómico pode ser um alvo directo ou indirecto dos monómeros de resina, tendo sido registado em vários estudos *in vitro* dano no DNA provocado por diferentes monómeros das resinas compostas, como é o caso do TEGDMA (Eckhardt et al., 2009). Apesar do mecanismo envolvido na toxicidade genética dos monómeros de resina ainda não estarem completamente esclarecido, existem pelo menos dois mecanismos pelos quais o TEGDMA pode desencadear dano no DNA, como podemos ver na figura 19 (Schweikl et al., 2006).

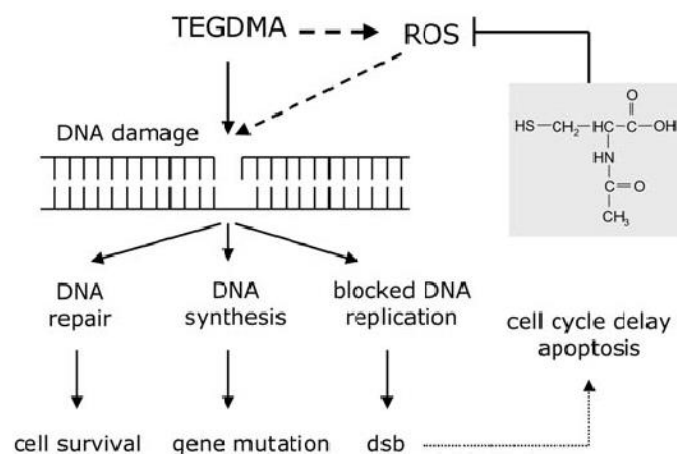


Figura 19: Modelo da indução da genotoxicidade nas células de mamíferos pelo TEGDMA e as respostas celulares. O dano no DNA pode ocorrer directamente, por meio da ligação covalente entre o TEGDMA e os centros nucleófilos da cadeia dupla de DNA, ou indirectamente, por meio da formação de ROS. A genotoxicidade e o atraso do ciclo celular são inibidos na presença do NAC. (Schweikl et al., 2006)

Os efeitos genotóxicos do TEGDMA podem ou não estar relacionados com o *stress* oxidativo. O dano no DNA pode ser devido ao aumento de ROS ou então devido a uma interacção entre o TEGDMA, mais concretamente com o carbonoβ da ligação dupla de carbono que tem carga positiva e vai reagir com os centros nucleófilos da cadeia dupla

de DNA ou das proteínas, por meio da reacção de adição de Michael, podendo resultar em mutações (Mavrogonatou, Eliades, Eliades & Kletsas, 2010). Uma das respostas das células aos efeitos genotóxicos do TEGDMA é através da activação dos mecanismos de controlo do ciclo celular uma vez que o atraso do ciclo celular é essencial para dar tempo a que haja reparação do DNA ou então a formação de quebras na cadeia dupla de DNA devido a um bloqueio na replicação do DNA. No entanto, caso ocorra uma replicação incompleta na qual o DNA esteja irreversivelmente danificado as células acabam por sofrer apoptose (Schweikl et al., 2006; Mavrogonatou, 2010).

De modo a que ocorram os processo de reparação do DNA devido ao dano no DNA, foi demonstrado que havia activação de mecanismos de controlo do ciclo celular que levavam ao atraso no ciclo celular, tanto na fase G1 como G2, de diferentes linhas celulares que eram expostas ao TEGDMA (Bakopoulou et al., 2009). Os mecanismos de controlo do ciclo celular são meios de regulação que monitorizam uma progressão adequada das fases do ciclo celular G1, S e G2 (Schweikl et al., 2005). A activação destes mecanismos do ciclo celular são uma resposta celular devido ao dano no DNA e permitem que a célula atrase ou interrompa o ciclo celular de modo a permitir uma reparação do DNA ou caso a lesão seja irreversível que haja uma activação dos processos que levam apoptose (Mavrogonatou et al., 2010). A regulação dos mecanismos de controlo é um processo complexo que envolve muitas moléculas e o mecanismo envolve normalmente vias dependentes da p53, mas vias independentes da p53, foram também detectadas (Schweikl et al., 2005). O p53 é uma proteína onco-supressiva que é considerada “o guardião do genoma” e participa nas respostas ao dano do DNA e nas perturbações do ciclo celular e sua disfunção está ligada à instabilidade genómica e ao cancro (Mavrogonatou et al., 2010).

Como já foi referido anteriormente, os efeitos genotóxicos e mutagénicos do TEGDMA podem resultar do aumento de ROS que induz dano no DNA (Krifka et al., 2011), sendo esta considerada uma das principais causas do dano endógeno do DNA, que incluem a oxidação do DNA e quebras na cadeia DNA (Schweikl et al., 2006). A indução do dano oxidativo no DNA de células expostas ao TEGDMA durante um longo período está relacionada com o aumento dos níveis 8-oxoguanina, que é um marcador do dano oxidativo do DNA, seguido da activação da ATM que pode activar vias que levam apoptose (Bakopoulou et al., 2009). A ataxia telangiectasia mutada (ATM) faz parte da família das proteínas quinase serina/treonina é rapidamente activada após o dano do

DNA sendo um importante regulador do ciclo celular (Eckhardt et al., 2009). Num estudo realizado por Eckhardt et al. (2009), ficou demonstrado que o TEGDMA provocava um aumento da formação da concentração da 8-oxoguanina sugerindo que o dano oxidativo do DNA era por meio de ROS.

Foram realizados diversos estudos utilizando diferentes métodos que mostraram que o monómero TEGDMA apresentava genotoxicidade/ mutagenicidade quando era posto em contacto com determinadas células. Os estudos realizados por Schweikl et al. (1999,2001,2007) mostraram através do estudo de micronúcleos que o TEGDMA aumentava a sua formação de forma dose dependente nos fibroblastos V79 do pulmão de hamster chineses (Bakopoulou et al., 2009). Este autor demonstrou através do teste Ames que o TEGDMA induzia deleções na cadeia de DNA da Salmonella e nas células V79 (Moharamzadeh et al., 2009). Outros autores, como o Kleinsasser et al. (2006), testaram a genotoxicidade em linfócitos periféricos e detectaram através da electroforese em gel de uma única célula (Comet Assay) que o TEGDMA provocava quebras na cadeia de DNA.

Foi demonstrado por vários estudos *in vitro* que as MAP-quinases (MAPK) são também influenciadas pelos monómeros de resina, como é o caso do TEGDMA. As MAPK são uma família de proteínas que incluem as quinases N-terminais Jun (JNKs), proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2), proteínas quinases activadas por stress (JNKs/SAPKs) e p38, entre outras, e são reguladores que medeiam sinais criados pelos factores de crescimento e pelos mitogénios do citoplasma para o núcleo (Mavrogonatou et al., 2010). Estas proteínas regulam as funções básicas da célula que são modificados pelos monómeros de resina como é o caso da viabilidade celular e apoptose, proliferação e diferenciação celular e a resposta imunitária como a expressão de citocinas e antigénios da superfície celular e respostas a variados estímulos de *stress* (Krifka et al., 2011). A proteína ERK1/2 está principalmente associada à regulação da proliferação celular, ou seja, à sobrevivência celular e parece prevenir a apoptose, enquanto que a JNKs e a p38 são activadas quando as células estão expostas a estímulos de *stress* e estão normalmente associadas à apoptose assim como à diferenciação celular e na resposta imunitária (Mavrogonatou et al., 2010). Ambas as proteínas ERK1/2 e JNK estão envolvidas na regulação das respostas celulares ao *stress* genotóxico (Eckhardt et al., 2009). O *stress* oxidativo induzido pelo TEGDMA vai provocar a activação das vias que controlam a sobrevivência e proliferação celular, em

que as MAPK, estão envolvidas, e ficou demonstrado que o aumento de ROS desempenha um papel importante na activação da MAPK (Eckhardt et al., 2009), tal como podemos observar na figura 20.

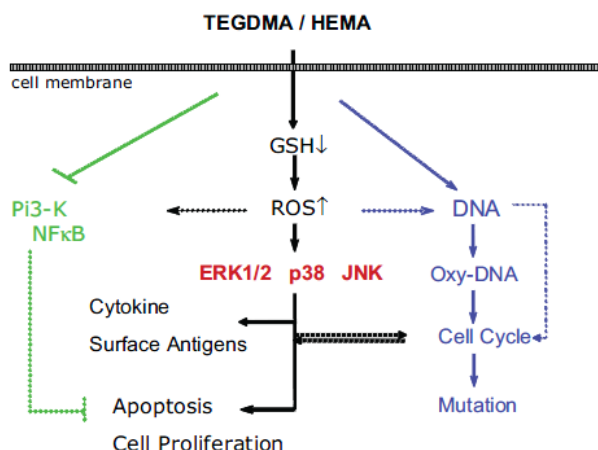


Figura 20: Resposta celular aos monómeros. Nas células expostas ao TEGDMA, vai ocorrer um aumento dos níveis de ROS devido à diminuição da GSH. O stress oxidativo resultante leva a uma activação da ERK1/2, p38 e JNK, que desempenham um importante papel na regulação das respostas celulares, como a produção de citocinas, expressão de antígenos de superfície, apoptose e proliferação celular. Os monómeros podem ainda provocar dano no DNA, directa ou indirectamente, e activação dos mecanismos de controlo do ciclo celular, que podem resultar em mutações. (Schmalz et al., 2011)

Existe alguma controvérsia sobre acção do TEGDMA na regulação das proteínas ERK1/2 isto possivelmente deve-se às diferentes concentrações de TEGDMA e linhas celulares que são utilizadas em cada estudo *in vitro* (Navrogonatou et al., 2010). No estudo realizado por Mavrogonatou et al. (2010), o TEGDMA promove a uma desfosforilação rápida e transitória e provocando à desactivação das ERKs nos HGFs, consistente com a diminuição da proliferação das células. No entanto, num estudo realizado por Krifka et al. (2011), mostraram que TEGDMA provoca a activação através de fosforilação das proteínas quinases ERK1/2, p38 e JNK nos macrófagos do rato RAW264.7. Tal como num estudo realizado numa linha celular da glândula salivar e nas células derivadas da polpa humana, onde se registou uma indução da ERK1/2 após a exposição ao TEGDMA (Mavrogonatou et al., 2010). Segundo Spagnuolo et al. não existe activação de ERKs nas células primárias da polpa humana após tratamento com o TEGDMA (Mavrogonatou et al., 2010). De acordo com Samuelsen et al., a indução das ERKs está relacionada apenas com o papel que elas têm na sobrevivência celular (Mavrogonatou et al., 2010). As proteínas JNKs são activadas em condições de stress e ocorre normalmente a sua desfosforilação quando as células como os macrófagos e células derivadas da polpa humana são expostas a concentrações elevadas de TEGDMA

(3mM) (Mavrogatou et al., 2010). Quanto à proteína p38 tanto no estudo realizado por Mavrogatou et al. (2010), como em estudos realizados previamente nas linhas células da glândula salivar, nos monócitos THP-1 e nas células derivadas na polpa humana, não se observou alterações nos níveis da proteína p38, mesmo após a exposição a altas concentrações de TEGDMA (Mavrogatou et al., 2010).

3.2.2.1.4 Sistema Imunitário e Marcadores Inflamatórios

As vias de transdução de sinal através das proteínas quinases MAPK dos factores de transcrição, como o NF- κ B são a primeira linha de defesa contra substâncias exógenas e vão estimular respostas nas células do sistema imunitário inato (Eckhardt et al., 2008). O sistema imunitário inato é activado quando há ligação entre as substâncias exógenas, como substâncias químicas, vírus, bactérias e produtos das bactérias como lipopolissacarídeos (LPS), com os receptores *toll-like* (TRL), desencadeando assim um processo inflamatório (Eckhardt et al., 2008). A inflamação é uma resposta de defesa do organismo e é regulado por moléculas de sinalização que podem ser citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6, TNF- α ou citocinas anti-inflamatórias como é o caso da IL-10 (Schmalz, Krifka & Schweikl, 2011). Eckhardt et al. (2009), analisaram através do método imune-enzimático indirecto (ELISA) as alterações na libertação de citocinas nos macrófagos RAW264.7 de ratinho provocadas pelo TEGDMA e verificou que este monómero inibia a libertação de TNF- α , IL-6 e IL-10 em 90% (Bakopoulou et al., 2009).

Os macrófagos são células constituintes do sistema imunitário que estão presentes na cavidade oral e que vão ser alvo das citocinas, que coordenam e iniciam os processos inflamatórios, sendo o factor de necrose tumoral α (TNF- α) a citocina chave nas reacções inflamatórias (Eckhardt et al., 2008). Foi demonstrado em vários estudos que o TEGDMA pode reduzir significativamente a reacção de defesa do sistema imunitário, mas o seu mecanismo permanece desconhecido. Este monómero por si só não consegue induzir a libertação do TNF- α nos monócitos THP-1, ele suprime a produção de citocinas induzidas por LPS nos macrófagos, mais especificamente do TNF- α e consequentemente provoca alterações na resposta inflamatória normal no tecido pulpar (Krifka et al., 2011). Eckhardt et al., demonstraram que o TEGDMA altera a produção de várias citocinas induzidas pela LPS. O TEGDMA suprime a produção da IL-6 e IL-10 e em concentrações mais elevadas inibe a expressão de antígenos de superfície,

como é o caso do CD14, e ainda de outros marcadores de superfície que são essenciais para o controlo da interacção das células imunitárias (Krifka et al., 2011; Eckhardt et al., 2008). Além disso, um estudo realizado por Gregson et al. (2008), mostraram que o TEGDMA induz a secreção da citocina MCP-1 nos monócitos derivados dos macrófagos U937 e aumenta a actividade hidrolítica dos fibroblastos gengivais humanos e consequentemente uma resposta inflamatória. A MCP-1 é uma quimiocina, que pertence a uma família especializada de citocinas, que funcionam como reguladores ou mediadores da inflamação. Os mediadores primários pró-inflamatórios, como a IL-1 e o TNF- α , vão induzir as quimiocinas, que são mediadores secundários pró-inflamatórios. Em resposta aos sinais inflamatórios, imunológicos ou infecciosos o organismo estimula a produção das quimiocinas, como é o caso da MCP-1 que tem como função recrutar os monócitos, macrófagos e linfócitos para os locais de infecção ou inflamação (Gregson, Platt & Windsor, 2008).

A inflamação é uma resposta do hospedeiro que é caracterizada pelo movimento de leucócitos e de fluídos do sangue para os tecidos extravasculares. Foi observado num estudo ao longo de 5-6 anos onde se colocou resinas compostas, de modo a modificar a forma dos dentes, e registou-se um aumento da inflamação gengival nos tecidos periodontais marginais adjacentes à restauração em comparação com os locais intactos (Gregson et al., 2008), tal como podemos verificar na figura 21. Esta inflamação pode ser devido a um aumento da actividade enzimática induzida pelo TEGDMA, devido ou por acção da MCP-1. Noutro estudo foi também registado o aumento de outros marcadores de inflamação como as prostaglandinas E2 nos macrófagos de murinos após a exposição ao TEGDMA (Bakopoulou et al., 2009; Gregson et al., 2008).

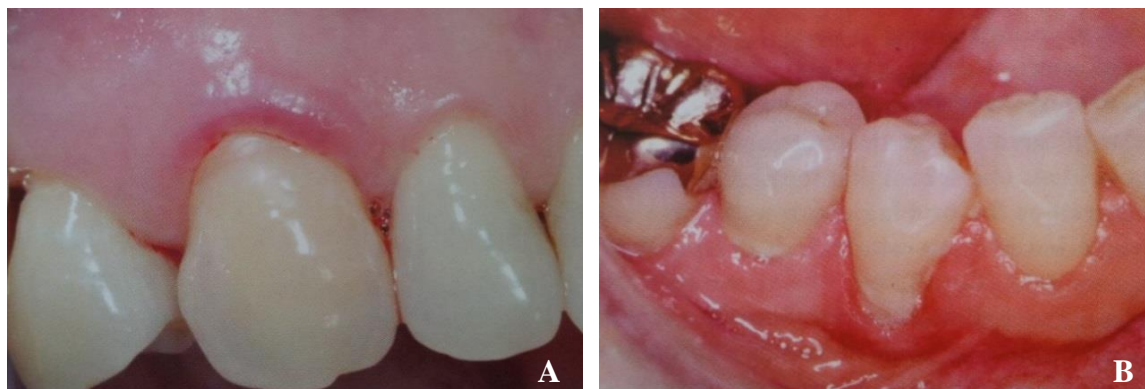


Figura 21: Inflamação gengival associada a restaurações à base de resina composta. (A) Resposta inflamatória ou possível reacção alérgica adjacente a uma restauração com resina composta de uma classe V (Anusayice, 2012). (B) Gengivite adjacente a uma restauração cervical com resina composta (Schmalz, 2009b).

Todos estes dados sugerem que o TEGDMA apresenta uma forte influência na interacção com as células imunitárias, incluindo a apresentação de antígenos, co-estimulação das células T e interacção célula-célula (Bakopoulou et al., 2009).

A exposição a longo prazo a concentrações subtóxicas do TEGDMA pode não só afectar as respostas imunitárias mas também alterar outros processos fisiológicos, tal como Schweikl *et al.* mostraram. O TEGDMA altera as vias que regulam a hemostase, a reparação dos tecidos, diferenciação celular, metabolismo celular e ainda a mineralização (Galler et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que o TEGDMA em concentrações baixas pode afectar tanto o processo normal de mineralização como o processo de diferenciação fisiológica de fibroblastos, nomeadamente dos fibroblastos pulpares em odontoblastos (Bakopoulou et al., 2009). O TEGDMA vai inibir funções específicas dos odontoblastos incluindo a actividade da fosfatase alcalina, a capacidade de mineralização da matriz, deposição de cálcio e expressão de genes assim como a sialoproteína (Krifka et al., 2011). O *stress* oxidativo é a causa mais provável dos distúrbios na mineralização provocados pelo TEGDMA (Krifka et al., 2011).

O TEGDMA pode também alterar a expressão de proteínas multifuncionais que estão envolvidas na protecção das células contra *stress*, como é o caso das proteínas de choque térmico (Hsp 72), que diminuíram 80% após da exposição dos monócitos humanos (THP-1) ao TEGDMA, mesmo em concentrações subtóxicas (Gregson et al., 2008). A medição deste tipo de proteínas após a exposição das células aos materiais é considerado um novo método para avaliação da citotoxicidade dos materiais (Moharamzadeh et al., 2009).

O TEGDMA é considerado, hoje em dia, um dos principais monómeros das resinas compostas que é libertado para a cavidade oral e pode levar a possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos nos tecidos orais (células gengivais e pulpares), uma vez que pode induzir *stress* oxidativo nas células e além disso, influencia significativamente as funções celulares envolvidas nas respostas imunitária, cicatrização dos tecidos e no metabolismo celular, mesmo em concentrações subtóxicas (baixas) (Mavrogonatou et al., 2010).

3.2.2.2 HEMA

O HEMA é mais um dos monómeros à base de ácido metacrílico que é utilizado nos materiais à base de resina, estando presente nos agentes de ligação em percentagens que variam de 35-50% e tem um importante papel no processo de impregnação dos sistemas adesivos (Çetingüç et al, 2007). O HEMA é um monómero hidrofílico permitindo assim uma diminuição da viscosidade das resinas e pode ainda entrar na rede de colagénio da matriz orgânica da dentina, prevenindo o colapso das fibras de colagénio e aumenta a força de união entre o sistema adesivo e o dente (Çetingüç et al, 2007). No entanto, devido ao seu baixo peso molecular e hidrofília pode difundir-se através da camada residual de dentina atingindo a polpa, por um lado pode provocar irritação pulpar por outro pode afectar a viabilidade dos odontoblastos adjacentes e alterar a divisão e actividade celular (Çetingüç et al, 2007). De acordo com Pashley, a permeabilidade dentinária pode ser alterada por vários factores como a espessura, smear layer, esclerose da dentina, pressão e fluido dentinário (Çetingüç et al, 2007). Num estudo realizado por Çetingüç et al. (2007), demonstraram que a difusão do HEMA aumenta com a diminuição da espessura da dentina remanescente.

O HEMA é um monómero à base de ácido metacrílico, ou seja um éster, que pode ser degradado por esterases não específicas e esterases da cavidade oral (Szczepanska et al., 2012). O HEMA pode ser libertado da matriz orgânica da resina e consequentemente difundir-se para a polpa ou por outro lado diluir-se na saliva podendo entrar na corrente sanguínea colocando em risco a sua segurança biológica, podendo alcançar concentrações suficientemente elevadas para induzir efeitos adversos biológicos (Durner et al., 2009). O principal produto de degradação resultante da hidrólise do HEMA é o ácido metacrílico (MAA) (Szczepanska et al., 2012). Foram propostas duas vias para a degradação do HEMA, como podemos ver na figura 22, a principal via

através da valina onde há libertação do MAA enquanto que na outra via que é por meio dos epóxidos que é caracterizada pela activação do MAA (Szczepanska et al., 2012).

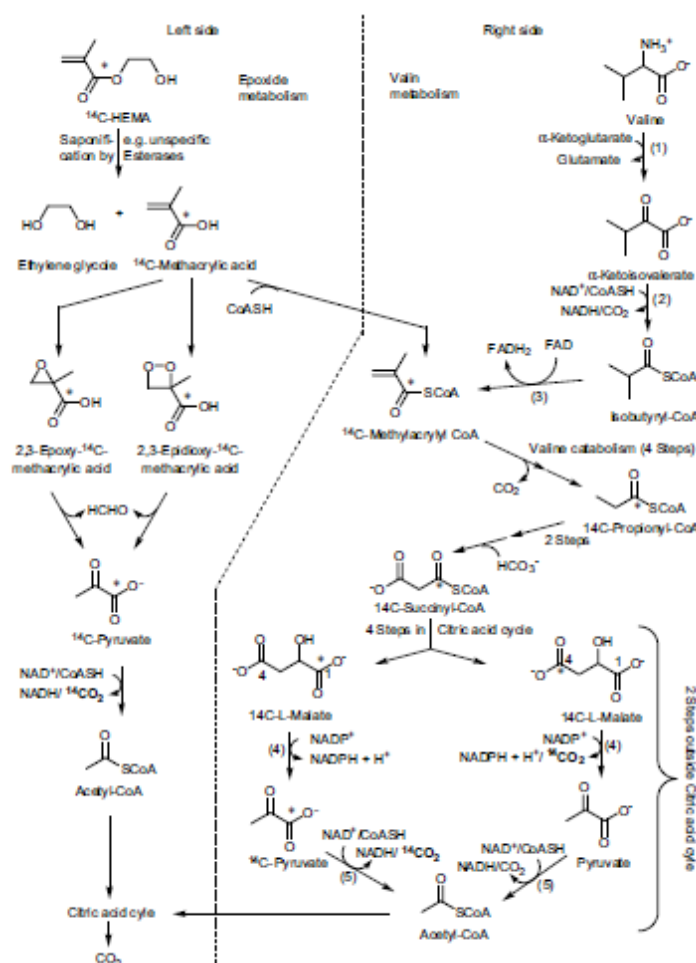


Figura 22: Metabolismo proposto do 14C-HEMA no rato (Durner et al., 2009)

O 14C-HEMA sofre hidrólise enzimática levando à formação do 14C-ácido metacrílico e do etilenoglicol. Na primeira via metabólica que foi proposta, o 14C-ácido metacrílico pode ser metabolizado de forma semelhante ao catabolismo do aminoácido valina, pois neste caso vai haver também a formação do tioéster do 14C-ácido metacrílico e coenzima A levando à formação do 14C-CoA metacrílico, um produto intermédio do metabolismo da valina (que está exemplificado no lado direito da figura 22). Consequentemente este componente é catabolizado levando à formação de 14C-L-malato e por fim após várias reacções à formação de ¹⁴CO₂ (Durner et al., 2009).

A segunda via possível de catabolismo do 14C-HEMA inicia-se da mesma forma que a via da valina. Neste caso, a ligação dupla de carbono do 14C-ácido metacrílico pode ser

oxidado formando intermédios epóxi, o 2,3-epoxi-ácido metacrílico através das mono-oxigenases (exemplificado do lado esquerdo da figura 22). A ligação dupla de carbono dos intermédios epóxi sofre oxidação e dão origem ao ^{14}C -piruvato e a formaldeído. Posteriormente o ^{14}C -piruvato é irreversivelmente catabolizado em acil-CoA e $^{14}\text{CO}_2$ (Durner et al., 2009).

A formação dos intermédios epóxi foi comprovada por vários estudos. Segundo Oilo, este descreveu o formaldeído como um produto de degradação dos compósitos (Durner et al., 2009). Enquanto que, Seiss et al., identificaram o 2,3-epoxi-ácido metacrílico como um intermediário no metabolismo do ácido metacrílico (Durner et al., 2009). Estes metabolitos de degradação do HEMA podem contribuir para o aumento da sua toxicidade, uma vez que foi demonstrado que a maioria dos epóxidos são considerados agentes tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos (Durner et al., 2009), por outro lado o MAA pode levar à libertação do $\text{TNF-}\beta$ e IL-6 nos macrófagos (Szczepanska et al., 2012). São necessários ainda mais estudos para determinar quais os produtos de degradação do HEMA que podem contribuir para a incompatibilidade biológica do HEMA.

Foram realizados muitos estudos que testaram a citotoxicidade deste monómero em diferentes culturas de células e com diferentes testes que reportaram diferentes níveis de toxicidade. O HEMA pode actuar como um irritante levando a reacções como prurido, rubefacção, parestesia persistente, hipersensibilidade, descoloração dos dedos e reacções alérgicas (Altintas & Usumez, 2009). Devido ao seu baixo peso molecular e teor hidrófilo pode difundir-se através das luvas provocando dermatite de contacto (figura 23) e por outro lado causar sintomas como faringite, asma e rinoconjuntivite (Chang et al., 2005).



Figura 23: Dermatite de contacto na extremidade do dedo de um médico dentista após o contacto com uma resina composta (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009)

Além disso, foi também demonstrado que o HEMA pode induzir genotoxicidade e apoptose. Pode interferir no ciclo celular e na síntese de DNA, podendo induzir interrupções no ciclo celular, levar ao *stress* oxidativo, pelo aumento de ROS e diminuição da GSH e pode ainda afectar a proliferação e sobrevivência celular (Durner et al., 2009). Segundo Falconi et al. e Issa et al., ambos demonstraram que o HEMA mesmo em baixas concentrações pode induzir a alterações nas actividades enzimáticas e morfológicas nas células dos mamíferos (Durner et al., 2009).

O método mais utilizado para a testar a citotoxicidade do HEMA e a viabilidade das células após o contacto com este monómero, é o teste do MTT apesar de existirem, outros tais como o azul tripano que foi utilizado num estudo realizado por Bouillaguet et al., 2000 e por Mantellini et al., (2006). Falconi et al. (2007), mostraram que o HEMA em concentrações de 3mmol/L não induz a morte celular, mas provoca alterações na morfologia nos fibroblastos gengivais humanos (Bakopoulou et al., 2009). Pelo contrário, Spagnuolo et al. (2006), utilizando o mesmo teste mostrou que o HEMA em concentrações superiores a 10mM provoca uma diminuição da viabilidade celular, da actividade mitocondrial e aumento da morte celular (Bakopoulou et al, 2009). Os efeitos citotóxicos foram observados nestes estudos mas quando comparados com os outros constituintes das resinas compostas, o HEMA parece ter uma menor citotoxicidade em relação aos monómeros bifuncionais e a citotoxicidade é dependente da concentração e do tempo de exposição (Bakopoulou et al., 2009).

Tal como foi descrito em inúmeros estudos a citotoxicidade induzida pelos monómeros de resina, como é o caso do HEMA, podem induzir *stress* oxidativo nos fibroblastos

gingivais humanos (HGF), pela indução do aumento dos níveis de ROS e diminuição GSH, que desempenha uma papel importante na regulação da respostas das células ao monómeros de resina, assim como alteração de certas funções celulares, como é o caso da redução da proliferação celular e aumento da apoptose (Bakopoulou et al., 2009; Ansteinsson, Solhaug, Samuelsen, Home & Dahl, 2011).

Ainda não foi esclarecido qual o mecanismo que leva à diminuição do GSH, por um lado há estudos que defendem que a diminuição intracelular dos níveis de GSH é devido ao aumento da produção de ROS que levam ao aumento da glutathiona oxidada (GSSG) (Chang et al., 2005). Por outro lado, Samuelsen et al., demonstraram que substâncias tóxicas, como o HEMA, podem ligar-se directamente à GSH nas células da glândula salivar diminuindo a capacidade de defesa oxidativa das células expostas a este monómero (Cataldi, Zara, Rapino, Patruno & Giacomo, 2012).

O ROS é formado sob condições fisiológicas ou como consequência de estímulos exógenos ou endógenos incluindo citoquinas, factores de crescimento, endotoxinas bacterianas, radiação ou substâncias químicas (Krifka et al., 2012). O HEMA, mesmo em baixas concentrações, pode levar ao aumento de ROS, que pode levar a desordens metabólicas e consequentemente comprometer a sobrevivência celular e podem ainda estar associados a alterações na regulação das vias de transdução que regulam a sobrevivência celular podendo levar a apoptose, interferem ainda na proliferação celular (Cataldi et al., 2012). O aumento do ROS pelo HEMA é de forma dose dependente e está envolvido na citotoxicidade dos monómeros de resina (Krifka et al., 2012). As alterações nos níveis do ROS e da GSH após a exposição ao HEMA foram analisadas em vários estudos, incluindo no estudo realizado Ansteinsson et al. (2011), que avaliaram a formação de ROS através da utilização do corante DCFH-DA e a concentração intracelular de GSH usando o MBrB e concluíram que inicialmente se registava uma diminuição dos níveis de GSH e consequentemente um aumento dos níveis de ROS.

Outro dos efeitos citotóxicos do HEMA nas células, é que este tanto em concentrações baixas como elevadas, pode induzir morte celular, mas os mecanismos que a desencadeiam ainda não estão completamente definidos (Cataldi et al., 2012). Vários estudos, incluindo um realizado por Paranjpe et al., mostraram que a morte celular induzida pelo HEMA era dependente da concentração do monómero (Bakopoulou et al.,

2009). Num estudo realizado por Spagnuolo et al. (2006), demonstraram que o HEMA induzia a morte celular principalmente por necrose em vez de apoptose nos fibroblastos gengivais humanos (HGF), tal como podemos verificar na figura 24. No entanto, noutros estudos como o realizado por Cataldi et al. (2012) e Krifka et al. (2012), que mostraram nas células expostas ao HEMA, tanto em concentrações elevadas como com concentrações baixas, provocava uma redução da proliferação celular e indução de morte celular por apoptose.

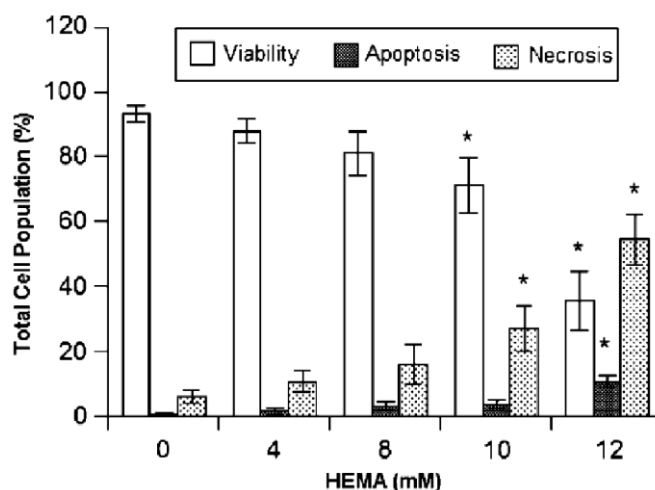


Figura 24: Exposição ao HEMA, após 24 horas era detectada e quantificada por citometria de fluxo os HGFs apoptóticos e necróticos (Spagnuolo et al., 2006)

O tipo de morte celular induzido pelo HEMA é avaliado após a coloração das células em estudo com os corantes anexina V e o iodeto de propídio e posteriormente através de citometria de fluxo as células apoptóticas (anexina V +) e as células necróticas (tanto PI + / anexina V + ou + PI sozinho) são detectadas e quantificadas (Cataldi et al., 2012).

Apesar dos mecanismos que induzem apoptose não estarem ainda bem definidos, pensa-se que o *stress* oxidativo induzido pelo aumento de ROS, pode em parte ser responsável pela apoptose. No entanto, Spagnuolo et al. (2004), utilizando o método de coloração anteriormente descrito mostraram que o HEMA induzia a morte celular por apoptose nos fibroblastos da pele humana através da activação das caspases 8, 9 e 3 e que esta não era dependente da formação de ROS (Bakopoulou et al., 2009). Samuelsen et al. (2008), detectaram um aumento da apoptose e sugeriram que esta podia estar associada aos danos no DNA induzidos pelo HEMA. Por outro lado, outros estudos indicam que apoptose pode estar associada com a activação do NF- κ B e pela activação das MAP

quinasas, incluindo a fosforilação do JNK e p38 (Bakopoulou et al., 2009). A apoptose induzida pelo HEMA parece ser um importante mecanismo na formação e persistência de reacções de hipersensibilidade (Bakopoulou et al., 2009). Por último, a alteração da actividade ou dos níveis de determinadas proteínas, como é o caso da p53 e da ATM podem desencadear a apoptose (Samuelsen et al., 2008). Quando determinadas substâncias químicas, como HEMA, entram em contacto com a p53, estas provocam um aumento da fosforilação desta molécula, que serve de indicador da genotoxicidade das substâncias (Samuelsen et al., 2008). Esta fosforilação é precedida pela fosforilação da ATM que é desencadeada pelo dano do DNA (Samuelsen et al., 2008). Esta proteína pode activar a apoptose por meio da via mitocondrial, pela ligação da p53 às proteínas Bcl-2 ou pela alteração da expressão actuando como um factor de transcrição (Samuelsen et al., 2008).

Quanto à genotoxicidade, foi demonstrado que o HEMA pode interagir directamente com o DNA dos linfócitos humanos, induzindo quebras na cadeia de DNA e alterações nas suas bases, incluindo modificações oxidativas, que podem estar associadas com apoptose e alterações no ciclo celular (Szczepanska et al., 2012). A primeira resposta das células quando há dano no DNA é a activar os mecanismos de reparação, que podem não funcionar devido à ligação entre o HEMA e o DNA. Quando a extensão do dano no DNA é elevada, a célula vai activar os mecanismos de controlo do ciclo celular, normalmente os das fases G2/M ou G1/S, com objectivo de prolongar o tempo de necessário para a reparação do DNA, e caso não seja possível a sua reparação a célula entra em apoptose. Os estudos realizados por Schweikl et al. e Chang et al., mostraram paragem do ciclo celular nos mecanismos de controlo G0/G1 em várias linhas celulares que foram expostas ao HEMA e também outro estudo realizado por Schweikl et al. mostraram que havia uma acumulação das células V79 na fase G2 após exposição ao HEMA (Pawlowska, Poplawski, Ksiazek, Szczepanska & Blasiak, 2010). Para além do dano que o HEMA pode induzir no DNA nuclear, o HEMA apresenta igualmente a capacidade de induzir dano ao nível do DNA mitocondrial e consequentemente levar a alterações nas funções da mitocôndria e por isso induzir a apoptose pela activação de proteínas ancoradas na membrana da mitocôndria (Szczepanska et al., 2012).

Foi demonstrado em vários estudos que antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC), ascorbato e vitaminas (A, E e C) diminuem a citotoxicidade do HEMA e o dano no DNA induzido por este monómero (Spagnuolo et al., 2006). Concentrações elevadas de

NAC vão reduzir a toxicidade e a produção de ROS induzida pelo HEMA, no entanto, concentrações baixas de NAC têm um efeito pró-oxidante aumentando a produção de ROS e o dano celular induzido pelo HEMA (Spagnuolo et al., 2006).

Vários estudos avaliaram os efeitos a longo prazo do HEMA em concentrações e mostraram que o HEMA pode alterar a resposta inflamatória dos tecidos pulpare, pois provocava uma diminuição da secreção do TNF- α estimulada pela LPS pelos monócitos THP-1 e pelos monócitos do sangue periférico, como podemos verificar na figura 25. Além disso, induzem o aumento da COX-2 assim como a supressão de células imunitárias como Hsp72 (Bakopoulou et al., 2009). Outro dos efeitos a longo prazo é que o HEMA inibe a síntese do colagénio do tipo I, osteonectina e a expressão do mRNA da sialoproteína, além disso, impede a diferenciação das células pulpare em odontoblastos (Chang et al., 2005). O estudo realizado por Teti et al. (2008), mostraram que a exposição dos HGFs a concentrações de 3mM de HEMA, provoca alterações na síntese do colagénio do tipo I, detectado por imunofluorescência, e na expressão do RNAm, sugerindo que a proliferação e sua actividade eram modificadas, mesmo com o HEMA em concentrações subtóxicas (Bakoupoulou et al. 2009).

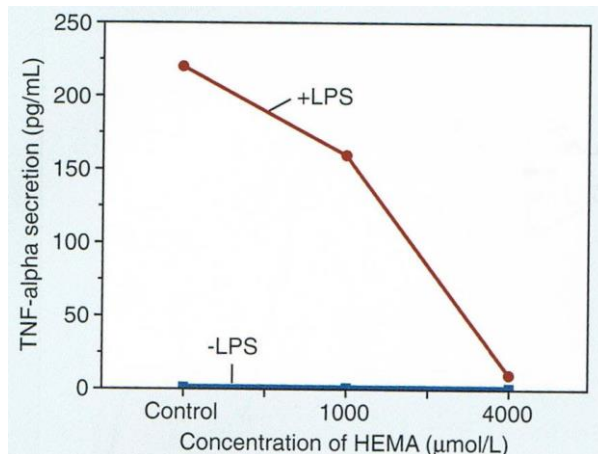


Figura 25: Redução da secreção do TNF- α nos monócitos, que eram estimulados pelo lipopolissacarídeo (+LPS) ou não estimulados pelo lipopolissacarídeo (-LPS), após exposição a diferentes concentrações do monómero HEMA. (Anusavice, 2012)

Apesar de todas estas interacções e efeitos que o HEMA pode provocar nos diferentes compartimentos celulares, este monómero apresenta uma citotoxicidade menor do que outros monómeros resinosos, como o TEGDMA e o Bis-GMA. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos são semelhantes aos induzidos pelo TEGDMA e os mecanismos afectados parecem os mesmos envolvendo o *stress* oxidativo por meio da produção de ROS, no entanto são necessários mais estudos *in vitro* para esclarecer exactamente os mecanismos afectados (Pawlowska et al., 2010).

3.2.2.3 Bis-GMA

As resinas à base de Bis-GMA foram introduzidas em 1960 por Bowen, Bis-GMA é um monómero aromático que apresenta um elevado peso molecular e viscosidade, o que limita a quantidade de carga inorgânica que pode ser introduzida na resina. Munksgaard et al., demonstraram que a quantidade de Bis-GMA nas resinas compostas varia entre 5-9 %wt (Reichl et al., 2008).

A citotoxicidade do Bis-GMA foi analisada em diversos estudos utilizando diversos métodos, mas o mais utilizado era o do MTT. Chang et al. (2009), através do método determinou que o Bis-GMA em concentrações superiores a 0.075mM induzia a citotoxicidade nos HGFs (Bakouloupou et al., 2009). Apesar de outros estudos, tal como o realizado por Engelmann et al. (2004), que avaliaram a citotoxicidade por meio da coloração com Hoechst 33342 (Bakouloupou et al., 2009)

Num estudo, em que se analisou a citotoxicidade de trinta e nove acrilatos e metacrilatos, conclui-se que o Bis-GMA é um dos monómeros mais tóxicos (Chang et al., 2010), e que depende do tempo de exposição e da concentração do monómero (Bakopoulou et al., 2009).

O Bis-GMA pode sofrer acção das esterases, como é o caso da CE, que vão hidrolisar o grupo éster dando origem a dois produtos de degradação: ácido metacrílico (MAA) e éster bisfenol A bis (2,3- dihidroxipropil) (BADPE-4OH), que é um metabolito tetrahidroxilado, tal como está exemplificado na figura 26 (Kostoryz et al., 2003).

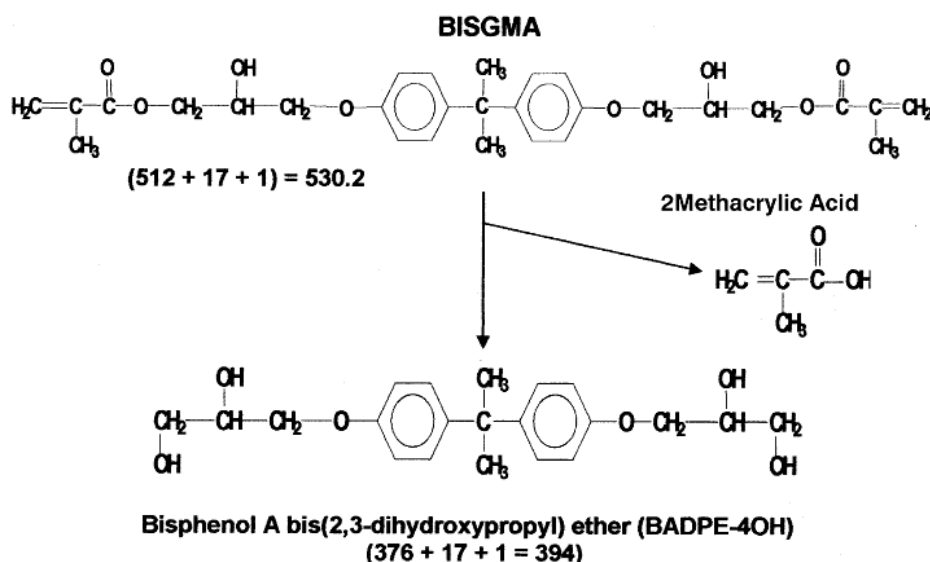


Figura 26: Produtos da metabolização do Bis-GMA (Kostoryz et al., 2003)

Qualquer um dos monómeros pode provocar citotoxicidade, inflamação tecidual ou qualquer outro tipo de efeito adverso nos tecidos, no entanto os produtos de degradação apresentam uma menor toxicidade em relação ao monómero que lhe deu origem. Kostoryz et al. (2003), analisaram a citotoxicidade dos metabolitos através do teste do MTT e a mutagenicidade através do teste de *Ames* e concluíram que os metabolitos resultantes da hidrólise do Bis-GMA apresentavam uma citotoxicidade menor e não provocavam efeitos mutagénicos nem estrogénicos nos fibroblastos L-929 do rato.

No entanto, alguns estudos mostraram que o Bis-GMA pode desencadear efeitos estrogénicos. Olea et al., utilizaram o teste E-screen e mostraram que as resinas à base de Bis-GMA desencadeavam efeitos estrogénicos, confirmado mais tarde por Schafer et al., que observaram a estrogénicidade do Bisfenol A e do Bis-GMA nas células MCF-7 (Moharamzadeh et al., 2009)

Tal como os outros monómeros descritos anteriormente, o Bis-GMA vai igualmente induzir uma rápida diminuição do GSH e consequentemente um aumento de ROS. Uma das consequências deste desequilíbrio vai ser morte celular por apoptose e são necessárias concentrações mais baixas de Bis-GMA para desencadear este fenómeno em comparação com o TEGDMA (Bakopoulou et al., 2009). Tais efeitos foram detectados por Engelmann et al. (2003), que avaliaram os níveis de GSH por meio do estudo MBrB e verificaram que o Bis-GMA provocava uma rápida e intensa diminuição do GSH nos HGFs, bem como apoptose, em concentrações relativamente baixas ($>0.1\text{mM}$)

(Bakoupoulou et al., 2009). Além disso, este aumento dos níveis intracelulares de ROS, podem influenciar o citocromo p450, aumentando a sua actividade (Drozd et al., 2011).

Foi demonstrado num estudo realizado por Drozd et al. (2011), de electroforese em gel de célula única (Comet assay), que o Bis-GMA é genotóxico nos linfócitos humanos, podendo mesmo interagir directamente com o DNA induzindo quebras na cadeia desta molécula.

A interrupção do ciclo celular pode resultar do desequilíbrio nas concentrações de ROS e das substâncias anti-oxidantes, como GSH ou por outro lado pode resultar do dano no DNA induzido pelo Bis-GMA, bloqueando a proliferação de modo a permitir reparação de DNA (Drozd, Wysokinski, Krupa & Wozniak, 2011). Há estudos que demonstram que o Bis-GMA provoca um aumento de células na fase S acompanhado por uma diminuição de células na fase G2/M (Drozd et al., 2011). No entanto, noutros estudos as células eram expostas ao Bis-GMA, paravam na fase G2/M (Chang et al., 2010).

As alterações celulares induzidas pelo Bis-GMA mencionadas anteriormente, como o aumento da apoptose e paragem do ciclo celular são mediadas pelas ROS, que podem activar proteínas regulam estes mecanismos, como é o caso da cdc2, ciclinaB1 e cdc25C. Os níveis destas proteínas dos respectivos RNAm diminuem por acção de ROS e consequentemente aumenta a interrupção do ciclo celular bem como apoptose, esquematizados na figura 27 (Chang et al., 2010). A catalase é uma hidroperoxidase que pode evitar as alterações nas células induzidas pelo Bis-GMA. Outro efeito do aumento de ROS é estimulação da heme oxigenase-1 (HO-1). A HO-1 é codificada por um gene que está envolvido nas respostas ao *stress* oxidativo e exerce um papel fundamental na citoprotecção das células bem como na resolução da inflamação tecidular, O aumento da expressão de HO-1 é considerado um mecanismo de defesa das células pulpares contra a toxicidade dos monómeros de resina (Chang et al., 2010).

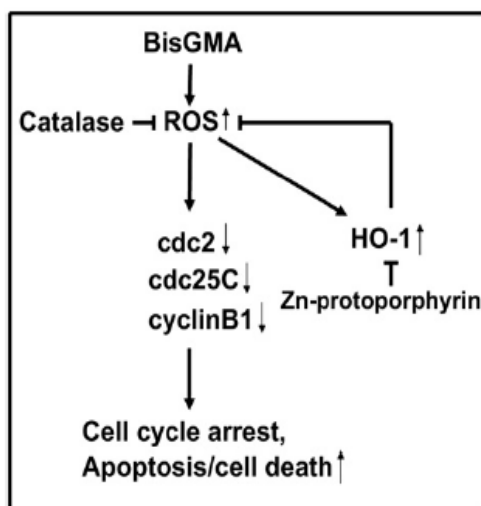


Figura 27: Mecanismo da produção de ROS induzida pelo Bis-GMA na mediação da interrupção do ciclo celular, apoptose e expressão de genes relacionados com o ciclo celular. O ROS também induz a produção de HO-1 (heme oxigenase 1), que por sua vez provoca a diminuição de ROS e consequentemente a diminuição da toxicidade do Bis-GMA, (Chang et al., 2010)

Os componentes das resinas compostas têm a capacidade de estimular a expressão dos mediadores inflamatórios tanto nas células pulpares como nas epiteliais. Os monómeros de resinas, como Bis-GMA provocam o aumento de ROS que induzem dano oxidativo ao nível do DNA, e a activação de várias vias de transdução de sinal que envolvem ATM, NF-kB e MAP quinases, nomeadamente a ERK, JNK e p38. A activação das MAP quinases por sua vez vai alterar a expressão dos mediadores inflamatórios como IL-6, COX-2 e PGE2. Como a indução da PGE2 pelo Bis-GMA resulta do aumento dos níveis intracelulares de ROS, certos antioxidantes como a NAC e a catalase podem prevenir a produção de PGE e consequentemente a morte celular (Chang et al., 2009).

O Bis-GMA é um dos principais constituintes das resinas comportas o que pode contribuir para citotoxicidade e genotoxicidade destes materiais. Apesar do seu teor hidrofóbico, que limita sua libertação, são necessárias concentrações menores deste monómero para provocar toxicidade, quando comparados com o HEMA e TEGDMA. Apesar dos mecanismos de citotoxicidade não estarem completamente esclarecidos, verifica-se que mesmo em concentrações baixas este monómero provoca *stress* oxidativo assim como perturbações nos processos fisiológicos normais interferindo essencialmente na diferenciação, resposta imune e ainda na capacidade de cicatrização (Bakopoulou et al., 2009).

3.2.2.4 UDMA

O UDMA é um monómero alifático e é normalmente utilizado como alternativa ao monómero aromáticos como Bis-GMA, uma vez que apresenta a vantagem de ter uma viscosidade menor permitindo a incorporação de mais partículas inorgânicas na resina e uma elevada resistência devido à flexibilidade das ligações uretano (Poplawski et al, 2010). Porém, este monómero permite uma maior absorção de água em relação aos monómeros aromáticos o que vai aumentar a susceptibilidade à degradação hidrolítica e enzimática da matriz, que se vai reflectir na alteração das propriedades mecânicas deste tipo de resinas, bem como numa maior degradação e um aumento de substâncias libertadas por estas resinas, o que vai comprometer a biocompatibilidade deste tipo de resinas (Poplawski et al, 2010). No entanto, este monómero apresenta uma estrutura e peso molecular diferentes, tem sido menos estudado em relação aos outros monómeros, sendo desconhecidos muitos dos seus mecanismos citotóxicos. Pensa-se que o que está na base destes efeitos são alterações no metabolismo da glucose devido a uma disfunção na mitocôndria ou devido ao *stress* oxidativo (Bakopoulou et al., 2009).

O UDMA que é libertado das resinas pode atingir níveis tóxicos nas células provocando morte celular, que neste caso é principalmente por necrose (Poplawski et al., 2010).

De acordo com um estudo realizado por Poplawski, et al. (2010) e outros realizados anteriormente mostraram que este monómero pode atingir concentrações que são suficientes para induzir não só efeitos citotóxicos mas também efeitos genotóxicos, provocando dano no DNA que pode resultar em morte celular nas células pulpares e outras.

3.2.2.5 Componentes do Sistema de Polimerização

As resinas compostas fotopolimerizáveis apresentam na sua constituição, iniciadores que participam na reacção de polimerização das resinas. Um dos fotoiniciadores mais utilizados é a canforoquinona (CQ) e está presente nas resinas em concentrações que variam de 0.2-1.5wt% (Volk, Xiemann, Leyhausen & Geurtsen, 2009). Os estudos demonstraram que a canforoquinona é uma das substâncias mais libertadas e de acordo com um estudo realizado por Taira et al., mostrou que a canforoquinona podia atingir níveis entre 0.06% até 0.1% (w/w) (Volk et al., 2009).

Os estudos que são realizados sobre a citotoxicidade das resinas compostas têm-se focado essencialmente nos monómeros que são libertados a partir destes materiais, no entanto existem alguns que falam sobre a citotoxicidade dos foto sensibilizadores. Estes estudos demonstraram que os iniciadores como a CQ, peróxido de benzoílo (BPO), Dimetilamino etil metacrilato (DMAEMA) e N-dimetil-p-toluidina são citotóxicos para as células podendo induzir a interrupção do ciclo celular e a morte celular (Bakopoulou et al., 2009). Além disso, alguns dos iniciadores e o BPO pode provocar reacções alérgicas bem como inflamação (Atsumi, Iwakura, Fujisawa & Ueha, 2001).

A CQ apresenta uma citotoxicidade moderada quando comparada com os outros fotoiniciadores e com os outros monómeros de resina (Bakopoulou et al., 2009) é dependente da dose e da irradiação da luz visível (Atsumi et al., 2001) e era menor quando comparada aos fotosensibilizadores aromáticos, como o benzil, benzofenona e 9-fluorenone (Bakopoulou et al., 2009).

Atsumi, et al. (2001) demonstraram, por meio da coloração com CDFH-DA e DCFH-DA e posterior análise espectrofotométrica, que a canforoquina induzia o aumento de ROS e a diminuição nos níveis de GSH em diferentes tipos de células, como nos fibroblastos gengivais e pulpares humanos. O desequilíbrio nos níveis destas duas substâncias vai provocar o *stress* oxidativo e consequentemente dano das macromoléculas das células, como por exemplo nas proteínas, ácidos nucleicos ou ácido gordos polinsaturados, o que pode resultar numa disfunção e por conseguinte a morte celular, quer por apoptose como por necrose (Volk et al., 2009). Além disso, pode levar à inibição dos mecanismos de reparação do DNA, provocando a diminuição da síntese de proteínas e pode ainda levar à interrupção do ciclo celular e alteração do metabolismo lipídico (Volk et al., 2009). De acordo com Pagoria et al., demonstraram que as canforoquinas podem provocar quebras na cadeia de DNA (Volk et al., 2009). Eckhardt et al. (2004), expuseram as células do ovário de hamster chinês à canforoquinaseguida do teste dos micronúcleos mostraram que este componente induzia efeitos citotóxicos e genotóxicos significativos. Apesar do estudo anteriormente descrito, existe ainda alguma controvérsia acerca da mutagenicidade e genotoxicidade da canforoquinonas sendo necessário a realização de mais estudos para confirmar estes fenómenos. Mesmo em concentrações subtóxicas durante longos períodos de tempo foi demonstrado que a CQ podia provocar efeitos tóxicos crónicos nos tecidos e células, como por exemplo, na integridade do genoma (Volk et al., 2009).

Tal como os monómeros resinosos, os anti-oxidantes como a N-acetilcisteína reduzem a formação de ROS mediada pela CQ e consequentemente a sua citotoxicidade (VOLK et al., 2009).

Para além da CQ, também outros componentes do sistema de polimerização podem comprometer a biocompatibilidade das resinas, como é o caso do DMABEE. Este componente pode induzir morte celular, tanto por necrose como por apoptose, nas células monoblastoides humanas e nos monócitos U-397, tal como foi demonstrado por Cimpan et al. (2005), que utilizaram o método de coloração das células com anexina V e PI e mostraram que a morte celular induzida era dependente do tempo de exposição e da concentração (Bakopoulou et al., 2009).

Podemos concluir, que as substâncias que estão envolvidas na polimerização das resinas podem contribuir ainda mais para a citotoxicidade das resinas, apesar dos seus mecanismos ainda não estarem completamente esclarecidos.

III. CONCLUSÕES

Biocompatibilidade descreve as reacções dos tecidos e do organismo após a colocação dos materiais. A avaliação da biocompatibilidade dos materiais dentários é complexa, uma vez que estes materiais são constituídos por diversos componentes com diversas funções.

Idealmente um material não deve, nem directamente nem indirectamente, libertar substâncias que provoquem efeitos adversos locais ou sistémicos. De modo a minimizar ou eliminar tais efeitos, os materiais são submetidos a uma avaliação biológica com objectivo de determinar o potencial tóxico dos materiais quando colocados na cavidade oral. Logo, antes que um material possa ser comercializado e utilizado clinicamente, tem de ser analisado por diversos estudos, dos quais podemos distinguir dois grandes grupos os testes *in vitro* e os *in vivo*. Os resultados obtidos nestes estudos por vezes são contraditórios e normalmente os estudos *in vitro* apresentam uma maior sensibilidade do que os *in vivo*. No entanto, de modo a assegurar a biocompatibilidade dos materiais dentários de uma forma eficiente e rentável, devem-se utilizar combinações de testes *in vitro* e *in vivo*, para a avaliação dos materiais, no qual se incluem os testes em animais e os clínicos. Os materiais só devem ser submetidos aos testes *in vivo*, quando apresentam resultados satisfatórios nos testes *in vitro*. De qualquer forma nenhum estudo pode garantir que um material é completamente seguro, logo é importante que os Médicos Dentistas estejam conscientes dos potenciais riscos dos materiais dentários de modo a identificar os possíveis efeitos adversos que estes materiais possam provocar aos doentes.

De forma a seleccionarmos os testes mais adequados a que os materiais devem ser submetidos, temos de ter em conta as suas características químicas, grau, frequência e duração de exposição ao organismo. Normalmente, os testes podem avaliar diferentes efeitos tais como citotoxicidade, toxicidade aguda, sub-crónica e crónica, irritação na pele, olhos e nas mucosas, sensibilização, hemocompatibilidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos na reprodução. No entanto, dependendo das características dos materiais, da sua função assim como do tipo de contacto que vão estabelecer com o organismo, a *International Organization Standardization* (ISO) definiu critérios para os testes de biocompatibilidade: ISO 10993 e ISO 7405. A ISO 10993 está dividida em 20 partes na qual a 10993-1:2009, “*Biological Evaluation of Medical Devices, Part 1:*

Evaluation and Testing”, contém uma série de *guidelines* para a selecção dos testes adequados, enquanto que as outras partes descrevem outros métodos que avaliam diferentes aspectos da biocompatibilidade. A norma ISO 7405:2008 complementa a norma anterior sendo específica para avaliação dos efeitos biológicos dos materiais utilizados em medicina dentária.

A norma ISO 10993-1:2009 divide ainda os testes que avaliam as reacções biológicas aos materiais em iniciais e suplementares. Os testes iniciais incluem os testes de citotoxicidade, toxicidade sistémica aguda e genotoxicidade, enquanto que os testes suplementares avaliam a toxicidade crónica, carcinogenicidade e a biodegradação (ISO 10993-1:2009).

Foram realizados vários estudos utilizando diferentes métodos que confirmaram que a maioria dos constituintes dos materiais dentários mais concretamente das resinas compostas têm a capacidade de induzir tanto efeitos citotóxicos como genotóxicos em concentrações relevantes quando são colocados na cavidade oral, no entanto são necessários mais estudos de modo a esclarecer quais os seus mecanismos. Dos diferentes efeitos que são provocados por estas substâncias podemos destacar as perturbações nas funções básicas das células, tais como na proliferação celular, em actividades enzimáticas, na morfologia celular, na integridade da membrana, no metabolismo celular e na viabilidade celular, entre outros. Os sinais envolvidos na resposta imunitária, na hemostase e na reparação dos tecidos podem ser igualmente alterados.

Existem testes específicos que devem ser realizados, dependendo do tipo de material, que nos caso das resinas compostas são os testes de citotoxicidade e da genotoxicidade.

Uma das divisões da norma ISO 10993-5:2009, *“Tests for cytotoxicity - In vitro Methods”*, destina-se aos métodos que são utilizados para avaliar do potencial de cada material para causar dano nas células em cultura. Segundo esta norma a determinação da citotoxicidade pode ser dividida em várias categorias, ou seja, naqueles que avaliam o dano celular pelas alterações morfológicas verificadas nas células, medição do crescimento celular ou de aspectos específicos do metabolismo celular. Dependendo do tipo de teste utilizado, podemos fazer uma avaliação qualitativa (avaliação morfológica) ou quantitativa da citotoxicidade, sendo a última preferível. Os testes quantitativos propostos por esta norma são teste de citotoxicidade do MTT e do XTT, estudo do LDH

e métodos colorimétricos como por exemplo o corante vermelho neutro (ISO 10993-5:2009).

No que diz respeito aos efeitos genotóxicos a norma ISO 10993-3:2003, “*Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity*”, no qual indica quais os estudos que devem ser utilizados para determinar se as células que são expostas ao materiais sofrem alterações ao nível da estrutura dos cromossomas ou do DNA/ mutações genéticas. Os três principais tipos de efeitos genotóxicos são as mutações genéticas, aberrações cromossomas e efeitos no DNA. Não existe nenhum teste *in vitro* que consiga detectar estes três tipos de efeitos simultaneamente. Os testes das mutações genéticas e da aberração nos cromossomas detectam as lesões na molécula de DNA; enquanto que os testes dos efeitos no DNA detectam os efeitos que levam ao dano celular. Segundo esta norma, os testes que são indicados para detecção das mutações genéticas são o teste Ames ou testes *in vitro* que utilizam células de mamíferos, como as células do linfoma do rato, enquanto que os testes que avaliam os efeitos no DNA é o teste dos micronúcleos (ISO 10993-3:2003).

Recentemente, foi recomendado pela ISO 10993-1, que na escolha dos testes para avaliação dos materiais que eram polimerizados *in situ*, como é o caso das resinas compostas, tem de se ter em conta o potencial tóxico dos monómeros e de outros componentes envolvidos na polimerização. Os métodos utilizados na determinação dos efeitos adversos dos componentes libertados da rede polimérica das resinas e dos produtos resultantes da sua degradação, estão enunciados na norma ISO 10993-13:2010, “*Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices*”, dos quais se destacam os métodos analíticos cromatográficos e os espectrométricos. Os métodos cromatográficos incluem a cromatografia líquida de alta resolução ou a gás, que permite a detecção dos monómeros residuais e aditivos e a espectrometria em massa que é para a identificação dessas substâncias. Os métodos espectrométricos incluem a espectroscopia ultravioleta e infravermelha, ressonância nuclear magnética e a espectroscopia em massa que permitem a identificação, composição e distribuição dos monómeros residuais (ISO 10993-13:2010).

A frequência de reacções adversas aos materiais dentários, tanto nos doentes como nos médicos dentistas, aumentou nestes últimos anos, nomeadamente as reacções alérgicas, porém o número de doente no qual se identifica este tipo de reacções é inferior ao

número total de indivíduos que apresentam este tipo de materiais. Apesar do risco dos materiais ser baixo, este facto difere devido à existência de variações inter-individuais nas respostas imunitária e nos processos de reparação, ou seja, há indivíduos mais susceptíveis do que outros principalmente no que diz respeito às reacções alérgicas.

Apesar da evidência científica que existe em relação aos efeitos citotóxicos das resinas compostas e das suas substâncias, poucos esforços têm sido feitos no desenvolvimento de novos materiais ou na melhoria das propriedades biológicas. No entanto, é importante promover o desenvolvimento de novos materiais menos citotóxicos e mais biomiméticos que possam ser utilizados de modo a restaurar de forma o mais natural possível os tecidos dentários, sem comprometer a viabilidade dos tecidos orais.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Altintas, S.H. e Usumez, A. (2009). HPLC analysis of HEMA released from two different adhesive systems. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 91(2), 924-929. doi: 10.1002/jbm.b.31476
- Ansteinsson, V., Solhaug, A., Samuelsen, J.T., Holme, J.A. e Dahl, J.E. (2011). DNA-damage, cell-cycle arrest and apoptosis induced in BEAS-2B cells by 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Mutation Research*, 723(2), 158-164. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.011
- Anusavice, K.J. (2012). Biocompatibility. In Anusavice, K.J., Shen, C. e Rawls, H.R. (Eds.), *Phillip's Science of dental materials* (pp.111-148). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Arossi, G.A., Lehmann, M., Dihl, R.R., Reguly, M.L. e Andrade, H.H.R. (2010). Induced DNA damage by dental resin monomers in somatic cells. *Basic & Clinical Pharmacology Toxicology*, 106(2), 124-129. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00479.x
- Atsumi, T., Iwakura, I., Fujisawa, S. e Ueha, T. (2001). The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. *Archives of Oral Biology*, 45(5), 391-401. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286804>
- Bakopoulou, A., Papadopoulos, T. e Garefis, P. (2009). Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3861-3899. doi: 10.3390/ijms10093861
- Batarseh, G. (2011). TEGDMA induction of apoptotic proteins in pulp fibroblasts. (Tese de Mestrado). Universidade de Indiana, Estados Unidos.
- Bettencourt, A.F., Neves, C.B., Almeida, M.S., Pinheiro, L.M., Arantes e Oliveira,, S., Lopes, L.P. e Castro, M.F. (2010). Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dental Materials*, 26(5), e171-e180. doi: 10.1016/j.dental.2010.01.006

- Brackett, M.G., Bouillaguet, S., Lockwood, P.E., Rotenberg, S., Lewis, J.B., Messer, R.L.W., Wataha, J.C. (2007). *In Vitro* of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 81(2), 397-402. doi: 10.1002/jbm.b.30676
- Cataldi, A., Zara, S., Rapino, M., Patruno, A. e Giacomo, V. (2012). Human gingival fibroblasts stress response to HEMA: a role for protein kinase C α . *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(2), 378-384. doi: 10.1002/jbm.a.34337
- Çetingüç, A., Ölmez, S. e Vural, N. (2007). HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dental Materials*, 23(3), 302-307. doi: 10.1016/j.dental.2005.08.013
- Chang, H.-H., Guo, M.-K., Kasten, F.H., Chang, M.-C., Huang, G.-F., Wang, Y.-L., ... Jeng, J.-H. (2005). Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*, 26(7), 745-753. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.021
- Chang, M.-C., Chen, L.-I., Chan, C.-P., Lee, J.-J., Wang, T.-M., Yang, T.-T., ... Jeng, J.-H. (2010). The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*, 31(32), 8164-8171. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.049
- Chang, M.-C., Lin, L.-D., Chan, C.-P., Chang, H.-H., Chen, L.-I., Lin, H.-J., ... Jeng, J.-H. (2009). The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE2 production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and -independent pathways. *Biomaterials*, 30(25), 4070-4077. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.034
- Drozd, K., Wysokinski, D., Krupa, R. e Wozniak, K. (2011). Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes. *Archives of Toxicology*, 85(11), 1453-1461. doi: 10.1007/s00204-010-0593-x

- Durner, J., Kreppel, H., Zaspel, J., Schweikl, H., Hickel, R. e Reichl, F.X. (2009). The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. *Biomaterials*, 30(11), 2066-2071. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.061
- Durner, J., Spahl, W., Zaspel, J., Schweikl, H., Hickel, R. e Reichl, F. (2010) Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dental Materials*, 26(1), 91-99. doi: 10.1016/j.dental.2009.08.014
- Eckhardt, A., Gerstmayr, N., Hiller, K., Bolay, C., Waha, C., Spagnuolo, G., ..., Schweikl, H. (2009). TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials*, 30(11), 2006-2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.045
- Eckhardt, A., Harorli, T., Limtanyakul, J., Hiller, K., Bosl, C., Bolay, C., ... e Schweikl, H. (2008). Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 30(9), 1665-1674. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.024
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A. e Zucco, F. (1990). Toxicity tests with mammalian cell cultures. In *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects* (75-98). John Wiley & Sons
- Emmler, J., Seiss, M., Kreppel, H., Reichl, F.X., Hickel, R. e Kehe, K. (2008). Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dental Materials*, 24(12), 1670-1675. doi: 10.1016/j.dental.2008.04.001
- Fano, V., Shatel, M. e Tanzi, M.L. (2007). Release phenomena and toxicity in polymer-based dental restorative materials. *Acta Biomedica Atenei Parmensis* 78(3), 190-197.
- Ferracane, J. (2011). Resin composite-state of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29-38. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.020
- Ferracane, J.L. (2006) Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*, 22(3), 211-222. doi: 10.1016/j.dental.2005.05.005

- Finer, Y. e Santerre, J.P. (2004). Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *Journal of Dental Research* 83(1), 22-26. doi: 10.1177/154405910408300105
- Freire, W. P., Fook, M. V. L., Barbosa, E. F., Araújo, C. S., Barbosa, R. C. e Pinheiro, I, M. (2012, Agosto). *Biocompatibilidade dos materiais restauradores odontológicos*. Comunicação apresentada no Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal/Rio Grande do Norte, Brasil.
- Galler, K.M., Hiller, K.-A., Cavender, A.C., Bolay, C., D'Souza, R.N. e Schmalz, G. (2011). TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *Journal of Dental Research*, 90(2), 257-262. doi: 10.1177/0022034510384618
- García, A.H., Lozano, M.A.M., Vila, J.C., Escribano, A. B. e Galve, P. F. (2006). Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal*, 11(2), E215-20.
- Gerzina, T.M. e Hume, W.R. (1996). Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine *in vitro*. *Journal of Dentistry*, 24(1-2), 125-128.
- Geurtsen, W. e Leyhausen, G. (2001). Chemical-biological interactions of the resin monomer triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA). *Journal of Dental Research*, 80(12), 2046-2050. doi: 10.1177/00220345010800120401
- Gociu, M., Pătroi, D., Prejmerean, C., Păstrăv, O., Boboia, S., Prodan, D. e Moldovan, M. (2013). Biology and cytotoxicity of dental materials: an *in vitro* study. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 54(2), 261-265. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23771068>
- Gonçalves, L., Filho, J.D.N, Guimarães, J.G.A., Poskus, L.T e Silva E.M. (2008). Solubility, salivary sorption and degree of conversion of dimethacrylate-based polymeric matrixes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, 85(2), 320-325. doi: 10.1002/jbm.b.30949
- Gregson, K. S., O'Neill, T., Platt, J.A. e Windsor, L.J. (2008). *In vitro* induction of hydrolytic in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol

- dimethacrylate and monocyte chemotatic protein-1. *Dental Materials*, 24(11), 1461-1467. doi: 10.1016/j.dental.2008.03.006
- Gregson, K.S., Windsor, L.J. e Platt, J.A. (2009). Biodegradation of a dental resin material by fibroblasts conditioned media. *Dental Materials*, 25(11), 1358-1362. doi: 10.1016/j.dental.2009.06.005
- Gupta, S.K., Saxena, P., Pant, V.A. e Pant A.B. (2012). Release and toxicity of dental composite. *Toxicology International* 19(3), 225-234. doi: 10.4103/0971-6580.103652
- Hagio, M., Kawaguchi, M., Motokawa, W. e Miyazaki, K. (2006). Degradation of methacrylate monomers in human saliva. *Dental Materials Journal*, 25(2), 241-246.
- ISO 10993-1:2009. Biological evaluation of medical devices — part 1: evaluation and testing within a risk management process. (2009). Suíça. Disponível em www.iso.org.
- ISO 10993-13:2010. Biological evaluation of medical devices — part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices. (2010). Suíça. Disponível em www.iso.org.
- ISO 10993-3:2003. Biological evaluation of medical devices — part 3: tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. (2003). Suíça. Disponível em www.iso.org.
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices — part 5: tests for cytotoxicity- in vitro methods. (2009). Suíça. Disponível em www.iso.org
- Janke, V., Von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Leyhausen, G. e Geurtsen, W. (2003). TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 82(10), 814-818. doi: 10.1177/154405910308201010
- Kleinsasser, N.H., Schmid, K., Sassen, A.W., Harréus, U.A., Staudenmaier, R., Folwaczny, M., Glas, J. e Reichl, F.-X. (2006). Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by

- the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*, 27(9), 1762-1770. Doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.023
- Kostoryz, E.L., Eick, J.D., Glaros, B.M., Welshons, J.W.V., Burmaster, S. e Yourtee, D.M. (2003). Biocompatibility of hydroxylated metabolites of BisGMA and BFDGE. *Journal of Dental Research*, 82(5), 367-371. doi: 10.1177/154405910308200508
- Krifka, S., Hiller, K.-A., Spagnuolo, G., Jewett, A., Schmalz, G., Schweikl, H. (2012). The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials*, 33(21), 5177-5186. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.013
- Krifka, S., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K., Spagnuolo, G., Schmalz, G. e Schweikl, H. (2011). Activation of stress regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials*, 32(7), 1787-1795. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.031
- Krifka, S., Spagnuolo, G., Schmalz, G. e Schweikl, H. (2013). A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34(19), 4555-4563. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.019
- Lin, B.A., Jaffer, F., Duff, M.D., Tang, Y.W. e Santerre, J.P. (2005). Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. *Biomaterials*, 26(20), 4259-4264. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.001
- Margeas, R.C. (2008). The Properties and Selection of Posterior Direct Restorations. *Academy of Dental Therapeutics and Stomatology*. Disponível em: 2 www.ineedce.com
- Martins, C.A., Leyhausen, G., Geurtsen, W. e Volk, J. (2012). Intracellular glutathione: a main factor in TEGDMA-induced cytotoxicity? *Dental Materials*, 28(4), 442-448. doi: 10.1016/j.dental.2011.11.022

- Mavrogonatou, E., Eliades, T., Eliades, G. e Kletsas, D. (2010). The effect of triethylene glycol dimethacrylate on p53-dependent G2 arrest in human gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 31(33), 8530-8538. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.074
- Michelsen, V. B., Moe, G., Strøm, M.B., Jensen, E. e Lygre, H. (2008). Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dental Materials*, 24(6), 724-731. doi: 10.1016/j.dental.2007.08.002
- Miletic, V., Santini, A. e Trkulja, I. (2009). Quantification of monomer elution and carbon-carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy. *Journal Dentistry*, 37(3), 177-184. doi: 10.1016/j.jdent.2008.11.006
- Moharamzadeh, K., Brook, I.M. e Noort, R.V. (2009). Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2(2), 514-548. doi:10.3390/ma2020514
- Murray, P. E., Godoy, C.G. e Godoy, F.G. (2007). How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirurgia Bucal*, 12(3), E258-E266. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468726>
- Murray, P.E., Lumley, P.J., Ross, H.F. e Smith, A.J. (2000). Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. *Biomaterials*, 21(16), 1711-1721. URL:<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2s2.00034086346&partnerID=40&md5=5f49a22c1b994da8d4168419e383c154>
- Neto, A.S.S.R. (2010). Glutathione: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas (Dissertação de Mestrado). Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Portugal.
- Noort, R.V. (2007). Resin composites and polyacid-modified resin composites. In *Introduction to Dental Materials* (99-126). Reino Unido: Mosby
- Obradović-Djuričić, K., Medić, V., Radišić, M. e Laušević, M. (2011). Correlation between the degree of conversion and the elution of leachable components from dental resin-based cements. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(9), 1307-1323. doi: 10.2298/JSC100610113O

- Park, J., Ye, Q., Topp, E.M., Misra, A. e Spencer, P. (2009). Water sorption and dynamic mechanical properties of dentin adhesives with a urethane-based multifunctional methacrylate monomer. *Dental Materials*, 25(12), 1569-1575. doi: 10.1016/j.dental.2009.07.010
- Pawlowska, E., Poplawski, T., Ksiazek, D., Szczepanska, J. e Blasiak, J. (2010) Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutation Research*, 696(2), 122-129. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.019
- Peutzfeldt, A. (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European Journal Of Oral Sciences*, 105(2), 97-116.
- Pietro, A.D., Visalli, G., Maestra, S.L., Micale, R., Baluce, B., Matarese, G., Cingano, L. e Scoglio, M.E. (2008). Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutation Research*, 650(2), 115-122. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.10.023
- Polydorou, O., König, A., Hellwig, E. e Kümmerer (2009). Long-term release of monomer from modern dental-composite materials. *European Journal of Oral Sciences* 117(1), 68-75. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00594.x
- Poplawski, T., Loba, K., Pawlowska, E., Szczepanska, J. e Blasiak, J. (2010). Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicology in Vitro* 24(3), 854-862. doi: 10.1016/j.tiv.2009.12.004
- Powers, J.M., Sakaguchi, R.L. (2006a). Biocompatibility of Dental Materials. *Craig's Restorative Dental Materials* (pp. 97-129). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Powers, J.M., Sakaguchi, R.L. (2006b). Resin Composite Restorative Materials. *Craig's Restorative Dental Materials* (pp. 189-234). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Rawls, H.R., Whang, K. (2012a). Resin-Based Composites. Anusavice, K.J., Shen, C. e Rawls, H.R. (Eds.), *Phillip's Science of dental materials* (pp.275-306). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Rawls, H.R., Whang, K. (2012b). Dental polymers. Anusavice, K.J., Shen, C. e Rawls, H.R. (Eds.), *Phillip's Science of dental materials* (pp.92-110). St. Louis, Missouri: Elsevier.

- Reichl, F.-X., Esters, M., Simon, S., Seiss, M., Kehe, K., Kleinsasser, N., Folwaczny, M., ... Hickel, R. (2006). Cell death effects of resin-based dental materials compounds and mercurial in human gingival fibroblasts. *Archives of Toxicology*, 80(6), 370-377. doi: 10.1007/s00204-005-0044-2
- Reichl, F.x., Kleinsasser, N., Kehe, K., Kunzelmann, K.H., Thomas, P., Spahl, W. e Hickel, R. (2008). Distribution and excretion of Bis-GMA in guinea pigs. *Journal of Dental Research*, 87(4), 378-380. doi: 10.1177/154405910808700401
- Ribeiro, A.B., Oliveira, C.R. (2008). Integração do Metabolismo-biossinalização. In Quintas, A., Freire, A.P. e Halpern, M.J (Eds), *Bioquímica Organização Molecular da Vida* (619-646). Lisboa, Portugal: Lidel
- Samuelsen, J.T., Holme, J.A, Becher, R., Karlsson, S. Morisbak, E. e Dahl, J.E. (2008). HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*. *Dental Materials*, 24(1), 134-140. doi: 10.1016/j.dental.2007.08.006
- Santerre, J.P., Shajii e Leung, B.W. (2001). Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed-polymeric-resin-derived products. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12(2), 136-151. doi: 10.1177/10454411010120020401
- Santerre, P., Shajii, L. e Tsang, H. (1999). Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *Journal of Dental Research*, 72(8), 1459-1468. doi: 10.1177/00220345990780081201
- Schedle, A., Örtengren, U., Eidler, N., Gabauer, M. e Hensten, A. (2007). Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clinical Oral Implants Research*, 18(3), 232-256. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01481.x
- Schmalz, G. (2009a). Determination of biocompatibility. In G. Schmalz e D. Arenholt-Bindslev (Eds.), *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 13-44). Berlim, Alemanha: Springer.
- Schmalz, G. (2009b). Resin-based composites. In G. Schmalz e D. Arenholt-Bindslev (Eds.), *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 99-138). Berlim, Alemanha: Springer.

- Schmalz, G. e Arenholt-Bindslev, D. (2009). Basic aspects. In G. Schmalz e D. Arenholt-Bindslev (Eds.), *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 1-12). Berlim, Alemanha: Springer.
- Schmalz, G., Krifka, S. e Schweikl, H. (2011). Toll-like receptors, LPS and dental monomers. *Advances in Dental Research*, 23(3), 302-306. doi: 10.1177/0022034511405391
- Schweikl, H., Altmannberger, I., Hanser, N., Hiller, K.-A., Bolay, C., Brockhoff, G., Spagnuolo, G., ... Schmalz, G. (2005). The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials*, 26(19), 4111-4118. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.026
- Schweikl, H., Spagnuolo, G. e Schmalz, G. (2006). Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10), 870-877. doi: 10.1177/154405910608501001
- Schwengberg, S., Bohlen, H., Kleinsasser, N., Kehe, K., Seiss, M., Walther, U.I., Hickel, R. e Reichl, F.X. (2005). In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *Journal of Dentistry*, 33(1), 49-55. doi: 10.1016/j.jdent.2004.08.001
- Seiss, M., Langer, C., Hickel, R. e Reichl, F. (2009a). Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin based dental restorative materials by use of GC/MS. *Archives of Toxicology*, 83(12), 1109-1115. doi: 10.1007/s00204-009-0470-7
- Seiss, M., Track, N., Hickel, R. e Reichl, F. (2009b). In vitro stability of methacrylate acid, TEGDMA e HEMA exposed to esterases. *Dental Materials* 25(8), 1044-1049. doi: 10.1016/j.dental.2009.03.005
- Sideridou, I., Tserki, V. e Papanastasiou, G. (2002). Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 23(8), 1819-1829.
- Sideridou, I.D. e Achilias, D.S. (2005). Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, e Bis-EMA from light-cured dental resins and resin

- composites using HPLC. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 74(1), 617-626.
- Singh, J., Khalichi, P., Cvitkovitch, D.G. e Santerre, J.P. (2007) Composite resin degradation products from BisGMA monomer modulate the expression of genes associated with biofilm formation and other virulence factors in *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88(2), 551-560. doi: 10.1002/jbm.a.31879
- Spagnuolo, G., D'Anto, V., Cosentino, C., Schmalz, G., Schweikl, H. e Rengo, S. (2006). Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 27(9), 1803-1809. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.022
- Stanislawski, L., Lefeuvre, M., Bourd, K., Soheili-Majd, E., Goldberg, M. e Périanin, A. (2003). TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 66(3), 476-482.
- Szczepanska, J., Poplawski, T., Synowiec, E., Pawlowska, E., Chojnacke, C.J., Chojnacki, J. e Blasiak, J. (2012). 2-Hydroxylethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts trough methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1561-1574. Doi: 10.1007/s11033-011-0895-y
- Van Landuyt, K.L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., ... Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials* 27(8), 723-747. doi: 10.1016/j.dental.2011.05.001
- Vasudeva, G. (2009, Junho). Monomer systems for dental composites and their future: a review. *Journal of the California Dental Association*, 37(6), 389-398.
- Vitral, J.C.A., Silva, A.A., Souza, M.A., Ferreira, A.P. e Vitral, R.W.F. (2008). Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. *Pesquisa Brasileira*

em Odontopediatria e Clínica Integrada, 8(3), 359-365. doi: 10.4034/1519.0501.2008.0083.0018

- Volk, J., Engelmann, J., Leyhausen, G. e Geurtsen, W. (2006). Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 22(6), 499-505. doi: 10.1016/j.dental.2005.06.002
- Volk, J., Leyhausen, G. e Geurtsen, W. (2011). Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 391-399. doi: 10.1002/jbm.b.31960
- Volk, J., Xiemann, C., Leyhausen, G. e Geurtsen, W. (2009). Non-irradiated campherquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 25(12), 1556-1563. doi: 10.1016/j.dental.2009.07.009
- Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal Of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203-209. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514810>
- Wataha, J.C. (2012). Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*, 28(1), 23-40. doi: 10.1016/j.dental.2011.08.595